



TITLE:

# 薬物肺移行性に関する研究( Dissertation\_全文)

AUTHOR(S):

吉田, 久博

---

CITATION:

吉田, 久博. 薬物肺移行性に関する研究. 京都大学, 1991, 薬学博士

ISSUE DATE:

1991-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3053056>

RIGHT:

②

# 薬物肺移行性に関する研究

吉 田 久 博

# 目 次

## 総論の部

緒 言 .....	1
第I章 還流肺における薬物移行性 .....	2
I-1 摘出肺灌流法の検討 .....	2
1-A 実験条件の設定 .....	3
1-B 考 察 .....	5
I-2 薬物の肺移行性 .....	6
2-A 肺蓄積性 .....	7
2-B 薬物脂溶性の影響 .....	8
2-C 投薬ルートの影響 .....	10
2-D 代謝阻害剤の影響 .....	10
2-E 還流液pHの影響 .....	11
2-F 薬物濃度の影響 .....	12
2-G 共存薬物の影響 .....	15
2-H 添加薬物の影響 .....	17
2-I 薬物結合性 .....	20
2-J 考 察 .....	21
I-3 抗生物質の肺移行性 .....	22
3-A 肺蓄積性 .....	22
3-B 薬物濃度の影響 .....	24
3-C 代謝物の検索 .....	24
3-D 薬物脂溶性の影響 .....	25
3-E 投薬ルートの影響 .....	27
3-F 考 察 .....	27
第II章 肺細胞内における薬物局在性 .....	28
II-1 還流肺の細胞成分分画 .....	28
1-A 細胞成分分画法の検討 .....	28
1-B 塩基性薬物の細胞内局在性 .....	30
1-C 投薬ルートの影響 .....	30

1-D	薬物濃度の影響	32
1-E	薬物脂溶性の影響	32
1-F	考 察	34
II-2	ミトコンドリアの薬物結合性	34
2-A	実験条件の検討	35
2-B	薬物結合性	36
2-C	共存薬物の影響	38
2-D	考 察	40
II-3	ミトコンドリア内における薬物局在性	42
3-A	ミトコンドリアの細分画	42
3-B	薬物脂溶性の影響	43
3-C	薬物濃度の影響	45
3-D	考 察	45
第III章	塩基性薬物蓄積部位としてのMAOの役割	46
III-1	ミトコンドリアにおける塩基性薬物のMAO阻害	46
1-A	ミトコンドリア局在酵素に対する塩基性薬物の影響	47
1-B	基質による阻害効果の変化	47
1-C	塩基性薬物の影響	49
1-D	薬物濃度の影響	49
1-E	薬物脂溶性の影響	50
1-F	阻害様式	51
1-G	考 察	52
III-2	灌流肺における塩基性薬物のMAO阻害	53
2-A	灌流条件の検討	53
2-B	塩基性薬物の影響	54
2-C	阻害様式	55
2-D	薬物脂溶性の影響	56
2-E	薬物濃度の影響	57
2-F	阻害効果の可逆性	58
2-G	考 察	59
III-3	塩基性薬物の肺蓄積部位におけるMAOの寄与	59
3-A	ミトコンドリアの薬物結合に及ぼすMAOIの影響	59

3-B	灌流肺の薬物蓄積に及ぼすMAOIの影響	62
3-C	考 察	64
結 論		66
謝 辞		69
実験の部		
第I章	実験の部	71
第II章	実験の部	78
第III章	実験の部	82
引用文献		85



## 総論の部

### 緒言

一般に生体に投与された薬物は吸収過程を経た後、作用部位に到達し、薬効を発揮する。しかしその他の部位に分布した薬物が予期せぬ副作用を発現することも多い。従って、薬物の有効性・安全性を的確に把握するためには、薬物臓器分布ならびに薬効を定量的に解析することが必要不可欠である。近年、薬物の吸収・分布・代謝・排泄等に関する知見が集積され、脳<sup>1)</sup>・肝臓<sup>2)</sup>・腎臓<sup>3)</sup>・脾臓<sup>4,5)</sup>・消化器<sup>1,2)</sup>・生殖器等<sup>6),7)</sup>における薬物分布挙動について定量的解析が行なわれるようになってきた。しかし、肺についてはマクロ的な把握に終始した報告が多く、薬理学的・生理学的見地からの詳細な薬物分布研究が切望されている。

肺はガス交換を行なう重要な器官であり、血液の貯留・ろ過、免疫機構、血液凝固線溶、ならびに各種生体内物質の取り込み・代謝・分泌などの多種多様な機能を営み、生体恒常性の維持に重要な役割を果たしている器官である<sup>8)</sup>。生物薬剤学的には吸入による治療や麻酔への応用、非経口投与された薬物およびリンパより吸収された薬物の初回通過効果などの観点より関心を集めている<sup>9,10)</sup>。従って、これら複雑な機能を有する肺での薬物動態を解明し、その分布機構を明らかにすることは、薬物を有効かつ安全に使用する上で重要である。しかし、肺での薬物挙動に関する系統的研究は未だ十分行なわれていない。著者は摘出肺還流法を始め、各種実験法を駆使して薬物肺移行特性について詳細に検討し、移行性を制御する薬物側要因ならびに生体側要因の解明を行なった。これらの知見は薬物体内分布特性を把握すると共に、薬効毒性発現機構を解明する上で有益な示唆を与えるものと思われる。

以下、得られた結果を3章にわたって論述する。



## 第1章 還流肺における薬物移行性

肺は肝・腎と異なり、細胞密度の極めて低い、スポンジ様の臓器である。しかし、生体内で最大の容積を占め、心臓から拍出された血液の全量が灌流している唯一の臓器である。肺の血管系は主として網目状に広がった毛細血管系より成り、その表面積は成人男子の場合  $70\text{m}^2$  に達する。この広大な肺血管床に存在する血液は安静時で  $60\text{ml}$  程度と大変少ない。しかし肺胞上皮細胞と毛細血管壁の厚さが  $0.5-1\mu\text{m}$  と極めて薄く、血液がこの広大な肺血管床を通過する極短時間（1秒以内）の間に効率良くガス交換を行ない、体組織に必要な十分量の酸素を取り込むことができる<sup>11)</sup>。肺の代謝機能も主にこの広大な血管床に存在する細胞ならびに酸素供給系に基づいており、混合静脈中の serotonin<sup>12-14)</sup>, prostaglandin<sup>15)</sup>, angiotensin<sup>16)</sup>, bradikinin<sup>17)</sup> など<sup>18,19)</sup>、他の臓器で産生された化学伝達物質を始め、様々な生理活性物質を極めて短時間のうちに代謝することができる。また肺はガス交換を容易に行なうために、肺胞側に表面活性物質を分泌する<sup>20)</sup>と共に、histamine, prostagrandin, SRS-A (slow-reacting substance of anaphylaxis), kallikrein など<sup>21)</sup>を放出することにより、生体恒常性維持に関与している。この様に多彩な機能を営んでいる肺への薬物分布特性について、近年ようやく注目されるようになってきた。しかしその研究は極めて断片的であり、各種薬物の肺移行性について系統的に検討することにより、薬物の肺移行性とその物理化学的特性との関係より分布機構を解明した報告はほとんど見当たらない。そこで、本章において摘出還流実験法を用いて、荷電・脂溶性・分子量など、物性の異なる種々の薬物の肺移行性について比較検討し、その移行特性の解明を試みた。

### 1-1 摘出肺灌流法の検討

一般に薬物の臓器移行機構をより詳細に検討するために in vitro 実験が広く用いられている。この実験方法にはホモジネート<sup>22)</sup>、単離細胞<sup>23,24)</sup>、スライス<sup>25,26)</sup>、臓器灌流<sup>27-29)</sup>などがある。これらのうち灌流法以外の方法は薬物が血管系を介することなく、直接組織あるいは細胞成分と接して移行することから、

in vivo 系における薬物取り込み機構を的確に反映した成績を得ることが困難である。これに対して、臓器灌流実験法は生体内での薬物挙動を正確に再現することができるため、薬物移行に関与する各種要因を的確に把握し、解明することが可能である。

摘出肺灌流法は Martin ら<sup>30)</sup>により開発されて以来、脂質・蛋白・糖類等<sup>31)</sup>の各種生体内物質の取り込み・代謝・蓄積ならびに排せつ機構などの研究に広く用いられ、種々改良が加えられてきた。また近年、肺の生理活性物質の取り込み・代謝・分泌などの研究にも応用されている。しかし肺への薬物移行性に関する系統的研究は乏しく、その解明が望まれている。以下、薬物肺移行性を検討するに先立ち、至適灌流実験条件を確立するために基礎的検討を行なった。

#### 1-A 実験条件の設定

摘出肺灌流法には種々の方法があり、その研究目的に応じて種々改良されている。これらの実験方法を系統的に整理すると、以下のように分類することができる。

- a) 灌流方法（1回灌流，循環灌流）
- b) 灌流様式（定圧灌流，定流灌流）
- c) 灌流液（Krebs-Ringer sol., BSA 含 Krebs-Ringer sol., 牛血清含 Krebs-Ringer sol., Polyethylene glycole 含 Krebs-Ringer sol., Whole blood）
- d) 肺胞換気様式（陽圧換気，陰圧換気，無換気）
- e) 換気ガス（carbogen gas, 5% CO<sub>2</sub> 含 air, air, oxygen gas）

以上の5点である。

a) 灌流方法： 1回灌流の場合、灌流液中薬物濃度の経時変化を詳細に追跡できることから、薬動力学的解析に広く用いられている<sup>13)</sup>。しかし、灌流液及び組織液中薬物濃度が平衡状態に達するまでに時間を要することから、平衡時の薬物相互の組織移行特性を比較検討するには適当ではない。これに対して、循環灌流では生体内の薬物挙動をより正確に反映させることができ、各薬物の肺蓄積性ならびにその相互作用を比較検討するのに適している。そこで摘出肺薬物移行性を検討する場合には循環灌流法（以下、還流法と呼ぶ）を、また摘出肺酵素活性の測定には1回灌流法を採用した。

b) 灌流様式： 安定した実験成績を得るためには灌流期間中安定した血圧と



血流を維持することが望ましい。しかし、一般に長時間にわたって灌流を行なった場合、時間の経過にともない血管系の収縮することが認められている<sup>27,28)</sup>。従って、定圧灌流では一定した流量を得ることが困難である。また流量計を用いて経時的な流量変化を絶えずチェックする必要があるため、肺灌流により薬物が代謝される場合、流量変動による薬物動態変化についても考慮する必要がある。これに対して、定流灌流ではこれらの欠点が無く、安定した薬動力学的解析を行なうことが可能である。しかし高速灌流した場合、特に肺では浮腫を生じ易いことから、実験前後の重量増加についてチェックする必要がある。予備実験として、ラット肺を用いて 8ml/min で 1 時間定流還流したとき、肺組織重量増加の程度が 0.1g 以下と僅かであったことから定流還流法を採用した。なお、還流速度についてはラット（体重約 200g）の場合、生理的血流速度が 8-16ml/min であることから安静時の 8ml/min を採用した。

c) 灌流液：一般に Krebs-Ringer sol. が広く用いられている。しかし肺は他の臓器と著しく異なり、蜂窩状含気性の臓器で、絶えず伸縮している。このためにコロイド浸透圧の差により浮腫を生じ易い。現在コロイド浸透圧の維持を目的として低分子デキストランが広く用いられている。しかし、デキストラン投与によりアナフィラキシー様反応を呈することが報告されており<sup>32)</sup>、物質透過性の変化することが予測される。また薬物結合性もアルブミンに比べて著しく低いことから、より生理的条件下での薬物肺移行性を検討するには適当ではない。また異種動物の血液を用いて実験を行なった場合、異種蛋白による様々な免疫反応を引き起こす可能性があり、正常時の薬物挙動を検討するには不適当である。従って使用動物の自己血のみで還流するのが最善と考えられる。しかし動物実験を行なう場合、動物の入手が容易であり、安定した供給が得られることは非常に重要である。そこで、実験動物にラットを使用し、摘出肺薬物移行実験の還流液にはラット血液と Krebs-Ringer sol. の等量混液を、また摘出肺酵素活性測定には 3.5% BSA 含 Krebs-Ringer sol. を使用した。

d) 換気様式：エネルギー系の関与している薬物取り込み機構あるいは代謝機構が存在する場合、無換気系の実験ではそれらが抑制されると予測されるため適当でない。また陽圧換気の場合、肺伸縮の際組織に負荷が掛かり、肺胞虚脱・拡張不全のため浮腫を起こし易いことが報告されている<sup>33)</sup>。著者も予備実験において同様の成績を得ていることから、より生理的条件下に近い陰圧換気を採用した。

e) 換気ガス：より生理的な状態を維持するためには十分な酸素供給を行なうことは言うまでもないが、灌流液組成との関係より考察する必要がある。すなわち重碳酸イオンを含まない灌流液では air あるいは 100% O<sub>2</sub> などを用いても灌流液 pH の変化は認められない<sup>34)</sup>。しかし、重碳酸イオンを含むものでは脱炭酸により灌流液 pH の上昇が予測される。Fig.1 は各種換気ガスを用いて灌流実験を行なったときの還流液の pH 変化を示したものである。Air, 100% O<sub>2</sub> を用いた時、灌流液 pH の速やかな上昇が認められたが、carbogen gas (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) を使用した場合、著明な変化は認められなかった。また 5% CO<sub>2</sub> + 95% N<sub>2</sub> を用いた時にも同様の成績を示したことから、重碳酸イオンを含む灌流液を用いる場合、5% CO<sub>2</sub> は pH 維持のために必須であると考えられる。また灌流液 pH の変化に基づく肺組織への影響について検討した結果、pH 7.0 または 8.0 で灌流した時、組織重量増加が著しく、浮腫を生じ易いこと、また血液が溶血し易いことを認めた。従って、換気には carbogen gas の使用が必須であり、灌流液 pH を 7.4 近傍に維持することが生理的な肺機能を長時間保つために重要であると判断される。

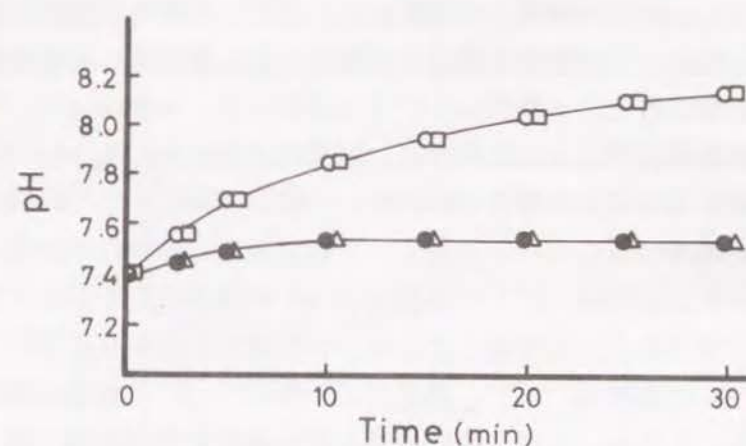


Fig.1 Effect of Ventilation Gas on pH in Perfusate  
●, carbogen gas; △, 95% N<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>; ○, air; □, 100% O<sub>2</sub>.

## 1-B 考 察

薬物肺移行性を研究するに先立ち、摘出肺灌流法の至適実験条件を設定するために基礎的検討を行なった結果、肺の生理的機能を維持するためには、換気に



carbogen gas を使用し、陰圧換気するのが最適であることを認めた。また薬物肺移行性を検討する場合灌流液にラット血液と Krebs-Ringer sol. の等量混液を用いた定流循環灌流法が、また摘出肺酵素活性測定には 3.5% BSA 含 Krebs-Ringer sol. を用いた定流一回灌流法が最も妥当であると判断される。すなわち、1) carbogen gas を用いることにより灌流液 pH が 7.4 近傍に維持できる、2) 灌流液を pH 7.4 近傍に維持することにより肺組織の損傷を最少限に抑制できる、3) 定流還流により安定した実験成績が得られる、4) 陰圧換気により生理的な肺機能を長時間維持できる、5) 循環灌流することによってより生理的な薬物挙動を把握することができる。6) 1 回灌流によって酵素活性の経時的な変動が詳細に解析把握できる。

これらの基礎的検討を元に以下の摘出肺灌流実験を行なった。

## 1-2 薬物の肺移行性

肺は生体構造上および生理機能上の特性から、近年、生物薬剤学的に注目を集めている<sup>35,36)</sup>。Brown<sup>37)</sup>は数種の塩基性薬物群が肺に選択的に蓄積されることから、体内薬物貯蔵器官として機能していると推察した。Anderson ら<sup>38)</sup>は構造類縁塩基性薬物の肺移行性について検討し、脂溶性よりもむしろ pKa の高い薬物の方が肺に蓄積し易いことを報告している。一方、Huang ら<sup>39)</sup>は 4 級アンモニウム化合物の組織移行性について検討し、これら薬物の肺移行率の低いことを報告している。また、Effros ら<sup>40)</sup>は肺組織中 pH が脈管系のそれよりも低いことが薬物蓄積性に寄与していると述べている。また更に、抗不整脈剤<sup>41,42)</sup>、ステロイド剤<sup>43,44)</sup>、向精神薬<sup>45,46)</sup>、麻薬<sup>47-49)</sup>など<sup>50,51)</sup>の肺移行性についても検討されている。しかし、これら研究の多くは、体内薬物分布の一端として行なわれたものであり、薬物相互の肺移行性について系統的に解析し、その挙動を的確に把握した報告は少ない。

近年、肺生理化学的機能を解明するために開発された摘出還流法を用いて、薬物肺内挙動について検討され始めた<sup>52,53)</sup>。しかし、肺組織を通過する際の薬物動態について、系統的に精査した報告は少ない。Orton ら<sup>54)</sup>が家兎摘出還流法により、pKa 8.5 以上の塩基性薬物が肺に移行し易いことを報告しているのみであり、他の報告<sup>55)</sup>も薬物個々の肺移行性について、速度論的解析を加えている

だけである。そこで薬物の肺分布機構を解明するために、摘出肺還流実験を行ない、物性の異なる各種薬物の肺移行性について比較検討して、その蓄積機構の解明を行なった。

## 2-A 肺蓄積性

薬物の肺蓄積特性を明らかにするために、各種薬物の還流液からの消失率について検討した。Fig.2 は 0.2mM の薬液を還流したときの、還流液中薬物残存率の経時変化を示したものである。還流液中薬物は実験開始後急速に消失した後、速やかに平衡状態に移行する消失カーブを描いた。各薬物の消失パターンはほぼ類似していたが、その消失率には薬物間で著明な差が認められた。しかし還流後、肺胞内洗浄液中にほとんど薬物が検出されず、また還流液中にも薬物代謝産物が検出できないことから、還流開始後薬物が還流液より急速に消失したのは、薬物が肺組織内に速やかに移行し、肺組織成分と結合したためと推察される。また肺組織中薬物量を定量した結果、還流液から消失した薬物量と肺組織中の薬物量とがほぼ等しい値を示した。従って、還流液より消失した薬物は未変化体のまま肺組織中に蓄積しているものと考えられる。一方、中性薬物である sulfanilamide や酸性薬物である sulfisoxazole の肺取り込みが低いことから、中性・酸性薬

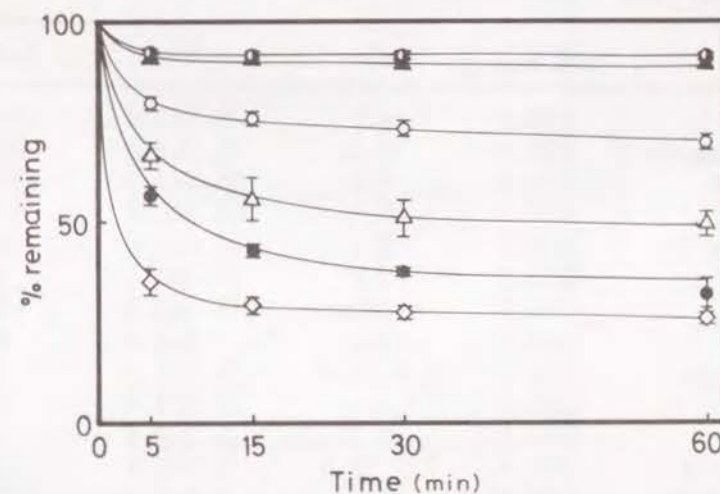


Fig.2 Time Courses of Drug Clearance from Perfusate  
Initial drug concentration in perfusate is 0.2mM.  
●, sulfisoxazole; ▲, sulfanilamide; ○, procainamide;  
△, metoclopramide; ●, quinine; ◇, diphenhydramine.



物に比して塩基性薬物の方が肺組織に移行し易いものと推察される。しかし、塩基性薬物中 procainamide は quinine, metoclopramide, diphenhydramine に比して消失率が低く、また procainamide ethobromide (P.A.E.B.) や N-methylnicotinamide chloride (N.M.N.Cl) では更に低値を示し、特異的な蓄積性を示さなかった。この事実は塩基性薬物の肺移行率には薬物間で差があり、肺移行率は塩基性基の有無によってのみ決定されるのではなく、更に別の要因によって制御されていることを示唆している。

## 2-B 薬物脂溶性の影響

薬物の肺蓄積に物理化学的特性の1つである脂溶性が関与しているか否か検討した。Table 1 に各薬物の還流液からの消失率とその脂溶性との関係を示した。なお、薬物脂溶性は chloroform と等張磷酸緩衝液 (pH 7.4) 間の分配係数で示した。塩基性薬物の肺蓄積率は各々の分配係数と良好な相関を示した (Fig.3)。相関係数は 0.976 と高く、有意であった ( $P < 0.01$ )。しかし、脂溶性が高く、血漿蛋白との結合性の高い酸性薬物の phenylbutazone は肺への移行率が低いことから、非塩基性薬物の肺蓄積に脂溶性の関与は少ないと推察される。

Table 1 Rate of Removal of Various Drugs from Perfusate by the Lung Preparation in Vitro

Drug	M.W.	pKa	% removal*	P.C.*
Imipramine	286.4	9.5	78.7±3.9	980
Diphenhydramine	255.4	9.0	73.9±0.4	442
Alloclamide	310.8	7.9	65.4±4.0	582
Quinine	324.4	8.4	68.5±2.6	64.2
Metoclopramide	299.8	9.0	50.6±3.9	12.0
Procainamide	235.3	9.2	30.1±2.1	0.17
N.M.N.Cl	172.6	strong	13.5±4.3	0.02
P.A.E.B.	344.3	strong	7.5±2.4	0.01
Sulfanilamide	172.2	2.4, 10.4	10.7±0.1	0.08
Isoniazid	137.2		11.4±4.4	0.04
P.A.S.	153.1	3.3	13.7±4.8	0.01
Sulfisoxazole	267.3	1.5, 5.0	8.8±0.8	0.02
Phenylbutazone	308.4	5.3	8.8±1.5	770

\* Initial concentration of drug in perfusate is 0.2mM

# Partition coefficients ( $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ , pH7.4)

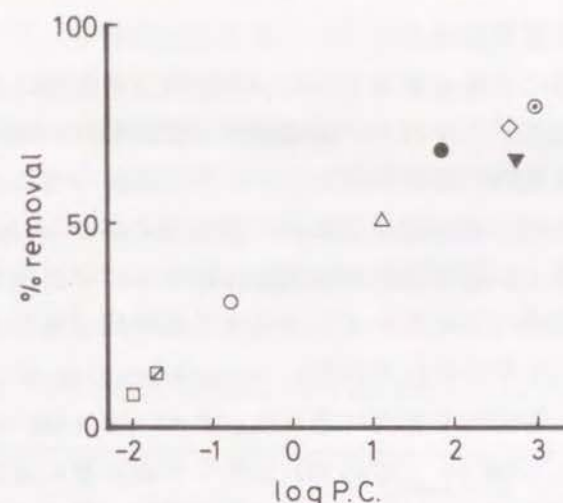


Fig.3 Relationship of % Removal from Perfusate (at 0.2mM) and Logarithm of Partition Coefficient ( $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ , pH7.4) of Basic Drugs

⊙, imipramine; ▼, alloclamide; ◇, diphenhydramine; ●, quinine; △, metoclopramide; ○, procainamide; ⊠, N.M.N.Cl; □, P.A.E.B..  $r=0.976$ .

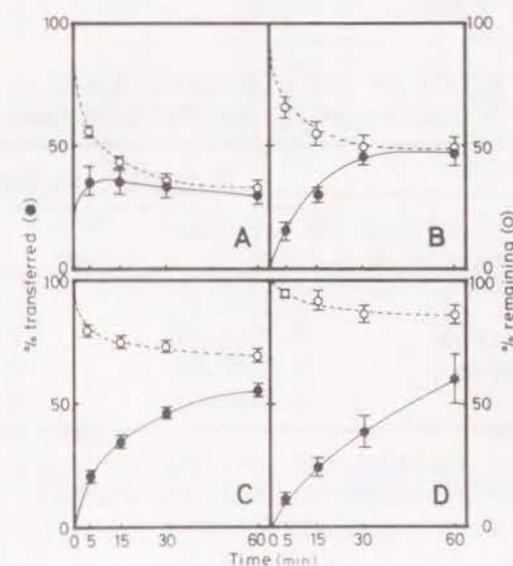


Fig.4 Time Courses of Drug Concentration in Perfusate after Drug Administration into the Trachea (●) or Perfusate (○) A, quinine; B, metoclopramide; C, procainamide; D, N.M.N.Cl. Dose, 2μmol.



## 2-C 投薬ルートの影響

薬物の肺蓄積性を更に明確にするために、薬物肺分布特性に及ぼす投薬ルートの影響について精査した。すなわち、還流液から肺組織への移行性の異なる薬物を肺胞側に投与し、各薬物の肺蓄積性ならびに還流液移行性について比較検討した。Fig.4 に示すように、還流液から肺への移行性の高い quinine は、肺胞から還流液への透過も速く、還流液中薬物濃度は速やかに平衡状態に到達した。肺胞から還流液への薬物移行率は2-Aで得られた薬物残存率とほぼ等しい値を示した。Quinine に比べてやや移行率の低い metoclopramide は、肺胞から還流液への薬物移行も遅く、約30分で平衡に達した。また metoclopramide よりさらに肺移行率の低い procainamide では約 60 分後に平衡状態に達した。これに対して、最も肺移行性の劣る N.M.N.Cl では更に肺透過性が悪く、60 分後においても平衡状態に達せず、肺胞から還流液へ徐々に移行した。これらの結果は、脂溶性の高い薬物ほど肺透過性が高く、速やかに平衡状態に達することを示している。また、この時の各薬物の肺内蓄積量は、肺透過性の低い N.M.N.Cl を除き還流液から肺への薬物移行量とほぼ等しく、有意差は認められなかった (Table 2)。従って、薬物肺蓄積に及ぼす薬物投与ルートの影響はほとんど無く、薬物移行の方向性はないものと判断される。

Table 2 Effect of Administration Route on Drug Accumulation in the Perfused Lung

Drug	Accumulation (μmol)	
	i.p. <sup>#</sup>	i.t. <sup>*</sup>
Quinine	1.22±0.05	1.16±0.05
Metoclopramide	0.86±0.06	0.86±0.06
Procainamide	0.52±0.04	0.75±0.13
N.M.N.Cl	0.28±0.03	0.52±0.05

# Drug was administered into the perfusate.

\* Drug was administered into the trachea.

## 2-D 代謝阻害剤の影響

脂溶性の高い塩基性薬物の特異的肺蓄積過程に能動輸送系が関与しているか否か明らかにするために、薬物肺移行性に及ぼす各種代謝阻害剤の影響について検

討した。すなわち、各種代謝阻害剤で 15 分間前還流した後、薬物を還流液に添加して更に還流を継続し、薬物の肺移行率を測定した。その結果、Table 3 に示すように、quinine の肺移行に変化は認められず、代謝阻害剤の影響は観察されなかった。また、imipramine の肺移行においても同様、代謝阻害剤の影響は認められなかった。従って、脂溶性の高い塩基性薬物の肺蓄積機構に能動輸送系の寄与は少ないと考えられ、pH 差に基づく分配あるいは、肺組織との特異な結合により蓄積するものと推察される。

Table 3 Effect of Metabolic Inhibitors on Uptake of Quinine by the Isolated Perfused Rat Lung

Inhibitor <sup>*</sup>	Conc. (mM)	% remaining		L/Pf
		5min	60min	
None		31.4±2.6	12.1±1.7	264±47
2,4-D.P.	0.01	34.7±2.6	13.0±1.2	280±70
	0.1	29.1±4.7	10.4±0.6	289±39
NaCN	0.1	38.0±1.3	12.1±0.4	233±35
	1	41.5±2.4	17.1±1.3	272±27
Quabain	0.01	34.3±3.5	12.0±0.7	289±44
	0.1	35.3±2.5	14.1±2.8	245±65
N <sub>2</sub> gas		24.7±2.2	12.9±1.0	312±62
I.A.A.	0.01	36.5±1.2	10.8±1.5	265±26
	0.1	33.8±2.9	11.0±0.5	215±27
N.E.M.	1	41.5±3.8	12.0±0.9	251±29
P.C.M.P.S.	0.1	32.3±1.2	9.8±1.4	232±40

\* 2,4-D.P., 2,4-dinitrophenol; N<sub>2</sub> gas, 95 % N<sub>2</sub> + 5 % CO<sub>2</sub>; I.A.A., iodoacetic acid; N.E.M., N-ethylmaleimide; P.C.M.P.S., p-chloromercuriphenylsulfonic acid mono-sodium salt.

## 2-E 還流液 pH の影響

一般に薬物は、細胞内外の pH 差に基づく分配、組織成分との特異的な結合等により組織に分布する。そこで薬物の肺蓄積に及ぼす pH 差に基づく分配の寄与を明らかにするために、肺への薬物移行に及ぼす還流液 pH の影響について検討した。Fig.5 は還流開始 30 分後に還流液 pH を 7.5 から 8.0 に変更し、更に 30 分間還流した時の、還流液中薬物の経時変化を示したものである。なお、還流液 pH が 8.0 の場合しばしば浮腫を生じるが、実験成績は intact な肺につ



いてのみ示した。Quinine, procainamide, sulfanilamide いずれの薬物消失曲線も pH の変更に対して僅かな変動を示すのみであった。さて、塩基性薬物の procainamide, quinine の pKa は各々 9.2, 8.4 であり、肺組織内 pH は 6.7 であると報告されている<sup>40, 56)</sup>。組織内外の pH 差に基づいて薬物が還流液から肺組織に移行する場合、還流液中遊離薬物濃度に対する組織中濃度の比 (L/P f) は、pH 7.5 から 8.0 への変更により、各々 6.2 から 18.8, 5.6 から 14.2 と約3倍に増加すると予測される (Henderson-Hasselbalch の式より算出)。しかし Fig.5 から明らかなように、薬物消失曲線の変動は少なく、薬物肺蓄積に pH 差に基づく分配の寄与は僅かであると判断される。

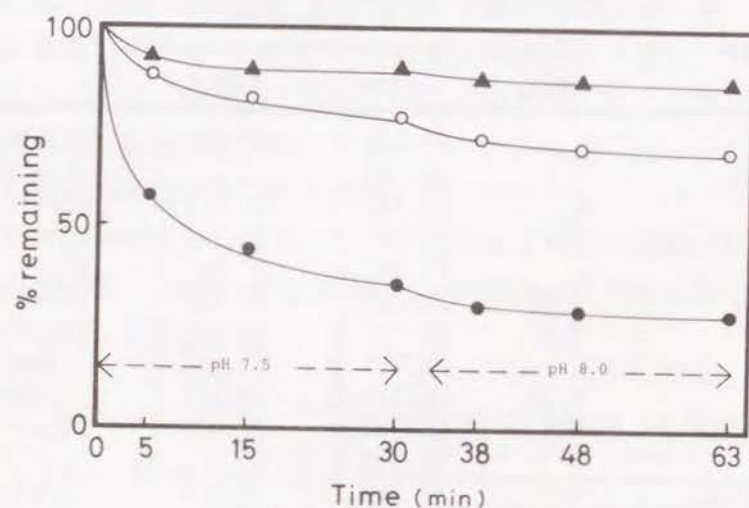


Fig.5 Effect of pH Change of Perfusate on Drug Clearance in the Isolated Perfused Rat Lung  
Initial drug concentration in perfusate is 0.2mM.  
▲, sulfanilamide; ○, procainamide; ●, quinine.

## 2-F 薬物濃度の影響

塩基性薬物の肺蓄積機構をより明確にするために、肺蓄積に及ぼす薬物濃度の影響について検討した。Fig.6 は各濃度の quinine を還流したときの、還流液中薬物残存率の経時変化を示したものである。各濃度とも消失様式に大きな変化はなく、還流初期に急速に減少し、速やかに平衡状態に移行するパターンを示した。しかし、薬物濃度の増加にともない、還流液からの消失率の低下が観察され、肺への取り込みに飽和過程のあることが示された。一方、procainamide では各

濃度ともほぼ等しい消失率を示した (Fig.7)。各薬物の還流液中薬物濃度変化に伴う薬物肺移行率の変動について検討した。その結果を Table 4 に示した。肺移行性の高い薬物ほど薬物濃度変化に伴う変動が顕著であり、濃度増加に伴って

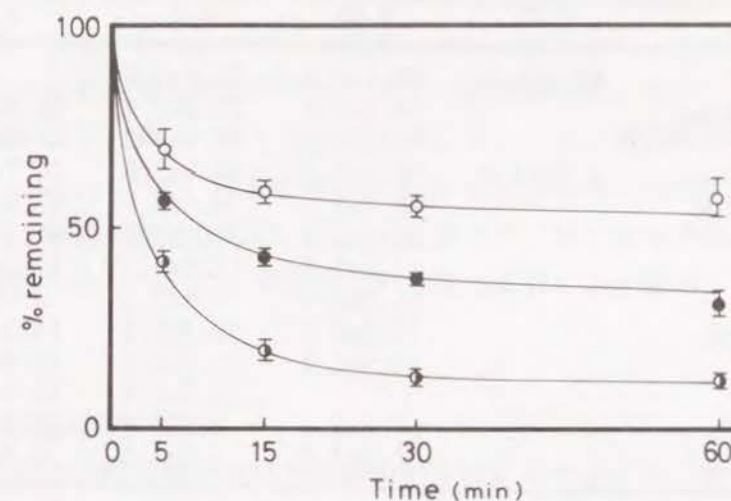


Fig.6 Effect of Initial Concentration on Quinine Clearance from Perfusate  
Initial concentration: ○, 2mM; ●, 0.2mM; ◐, 0.01mM.

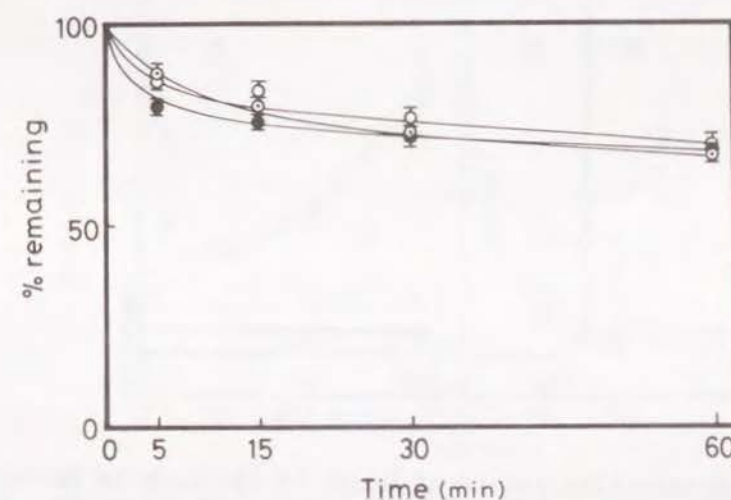


Fig.7 Effect of Initial Concentration on Procainamide Clearance from Perfusate  
Initial concentration: ○, 2mM; ●, 0.2mM; ◐, 0.05mM.



Table 4 Effect of Initial Concentration on Drug Clearance from Perfusate

Drug	% removal			
	Initial concentration (mM)			
	0.01	0.05	0.2	2
Imipramine	92.5±1.5	86.1±2.5	78.7±3.9	
Diphenhydramine		78.8±5.6	73.9±0.4	62.3±3.9
Alloclamide		78.3±7.0	65.4±4.0	47.5±1.5
Quinine	87.9±1.7	80.1±2.3	68.5±2.6	44.7±2.6
Metoclopramide		58.4±4.0	50.6±3.9	55.9±1.8
Procainamide		31.5±2.8	30.1±2.1	31.3±2.8
N.M.N.Cl		18.5±3.1	13.5±4.3	12.3±4.8
P.A.E.B.		11.2±2.1	7.5±2.3	9.6±2.9
Sulfanilamide		10.0±0.6	10.7±0.1	14.3±1.6
Isoniazid		19.9±2.4	11.4±4.4	16.4±1.5
P.A.S.			13.7±4.8	10.1±2.3
Sulfisoxazole		7.8±2.2	8.8±0.8	13.4±2.3
Phenylbutazone		5.6±1.2	8.8±1.5	9.3±4.3*

\* % removal at 1mM.

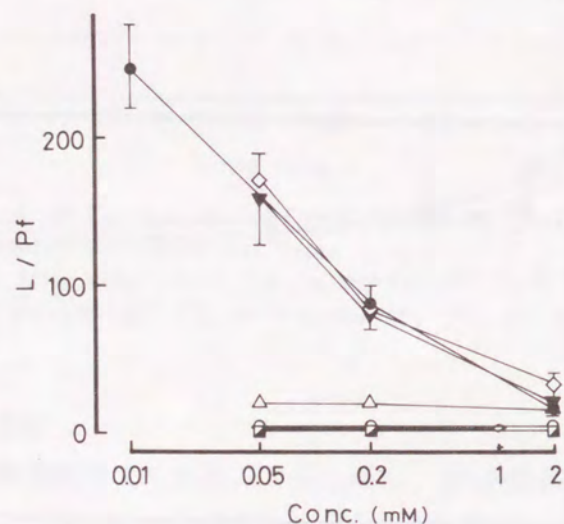


Fig.8 Concentration Ratios of Drugs in the Lung to Unbound Drug in Perfusate

◇, diphenhydramine; ▼, alloclamide; ●, quinine;  
△, metoclopramide; ○, procainamide; ◇, phenylbutazone;  
■, N.M.N.Cl, sulfanilamide, sulfisoxazole, P.A.S..

還流液からの薬物消失率が著明に低下した。すなわち、薬物肺移行に濃度依存性のあることを認めた。しかし、移行率の低い薬物では薬物濃度による影響はほとんど観察されなかった。従って、肺への薬物蓄積に組織成分との結合機構が関与しているものと判断される。これらの知見をさらに明確にするために、還流液薬物濃度の変化に伴うL/Pfの変動について検討した。その結果、Fig.8に示すように、大半の塩基性薬物では1以上の値を示した。また、脂溶性の高い薬物では濃度の低下に伴ってより高い値を示した。一方、脂溶性の高い酸性薬物のphenylbutazoneでは、各濃度共ほぼ1.5となったが、他の中性・酸性薬物では、各濃度共1前後の値を示した。以上の結果より、肺には塩基性薬物に対する特異な蓄積機構が存在し、主に肺組織との特異な結合により蓄積するものと考えられる。

## 2-G 共存薬物の影響

塩基性薬物の肺蓄積が組織との結合に基づくことをより一層明確にするために、quinine と他の塩基性薬物共存による取り込み競合実験を行なった。Fig.9にdiphenhydramine または metoclopramide を共存させて還流したときの成績を示した。両共存薬物とも quinine の還流液からの消失様式（還流開始直後の急激

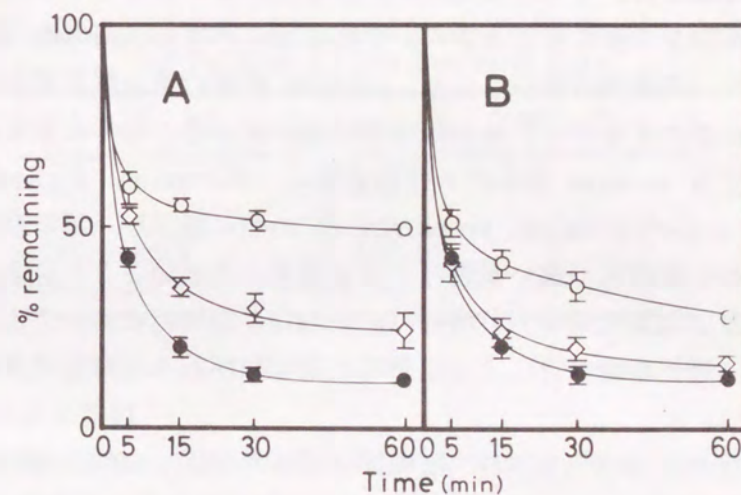


Fig.9 Effect of Diphenhydramine(A) and Metoclopramide(B) on Uptake of Quinine by the Isolated Perfused Lung  
Lungs were perfused with a mixture of 0.01mM quinine and none (●), 0.2mM (◇), or 2mM (○) a second basic drug.



Table 5 The Inhibition of Quinine Accumulation in the Isolated Perfused Lung by Various Basic Drugs

Inhibitor	Conc.(mM)	% remaining	% inhibition
None		12.1±1.7	
Imipramine	0.2	26.1±1.3	15.9±2.2
	2	64.1±1.8	58.0±2.2
Diphenhydramine	0.2	24.5±4.6	14.1±5.5
	2	49.7±2.4	42.8±2.9
Alloclamide	0.2	18.6±1.9	7.4±2.8
	2	51.2±2.5	44.5±3.0
Metoclopramide	0.2	16.2±2.2	4.7±3.1
	2	30.6±3.7	21.0±4.5
Procainamide	0.2	15.2±1.7	3.5±2.7
	2	24.8±1.4	14.4±2.3
N.M.N.Cl	0.2	11.1±0.5	-1.1±2.0
	2	14.4±1.4	2.3±2.5
P.A.E.B.	0.2	14.0±2.0	2.2±3.0
	2	10.1±2.3	-2.3±3.3

な消失と速やかな平衡状態への移行)に大きな影響を及ぼすこと無く, quinineの肺移行率を抑制した。その抑制効果は共存薬物濃度に依存していた。Table 5は各種塩基性薬物を共存させたときの, 平衡状態における quinine 消失率を示したものである。各薬物の共存により, quinine 肺移行率が低下すること, 薬物間で阻害効果に差のあること, その阻害率に濃度依存性のあることを認めた。また共存薬物による quinine 肺移行の抑制効果は imipramine, diphenhydramine, alloclamide, metoclopramide, procainamide の順に低下し, 肺に移行し易い薬物ほど, すなわち脂溶性の高い薬物ほど抑制効果の大きいことを認めた (Fig.10 A)。同様の現象は塩基性薬物共存時の imipramine 肺移行においても認められた。しかし, 中性・酸性薬物共存による塩基性の薬物肺移行への阻害効果は認められなかった (Table 6)。

各塩基性薬物の阻害特性をより一層明確にするために, 薬物共存時の肺組織中薬物濃度について検討した。Fig.10 B に共存薬物の脂溶性と共存時の L/P f (quinine) との関係を図示した。両者の間に良好な相関性が認められ, 各薬物の阻害効果に脂溶性が関与しており, 濃度依存性のあることが観察された。

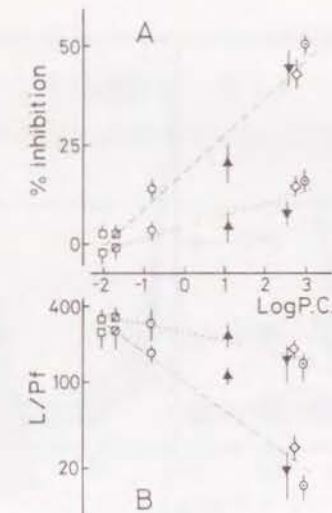


Fig.10 Relationship of the Ability of a Second Basic Drug to Inhibit Quinine Accumulation and Logarithm of the Partition Coefficient  
 --, 2mM of inhibitor; ---, 0.2mM of inhibitor.  
 A: % inhibition of quinine clearance from perfusate by another drug.  $r=0.969$ (at 2mM),  $r=0.871$ (at 0.2mM).  
 B: L/Pf concentration ratio of quinine at coexistence with another drug.  $r=-0.963$ (at 2mM),  $r=-0.951$ (at 0.2mM).  
 ⊙, imipramine; ◇, diphenhydramine; ▲, metoclopramide; ▼, alloclamide; ○, procainamide; ▣, N.M.N.Cl; □, P.A.E.B..

Table 6 Effect of Non-Basic Drugs on Uptake of Quinine by the Perfused Lung

Inhibitor	% remaining	% inhibition
None	12.1±1.7	
Sulfanilamide	12.5±1.9	0.5±2.9
Sulfisoxazol	11.1±2.0	-1.1±3.0
Phenylbutazone	13.3±1.1	1.4±2.3

## 2-H 添加薬物の影響

塩基性薬物に対する肺の特異的な結合部位の性状を更に詳細に検討するために置換実験を行なった。すなわち, quinine または imipramine を肺に取り込ませ, 平衡に達した時点で (30分後) 他の薬物を還流液に添加し, 更に還流を継続した。その時の還流液中薬物濃度変化を Fig.11 に示した。中性・酸性薬物ならびに塩基性薬物でも脂溶性の低い P.A.E.B. あるいは N.M.N.Cl を添加した時, 還流液

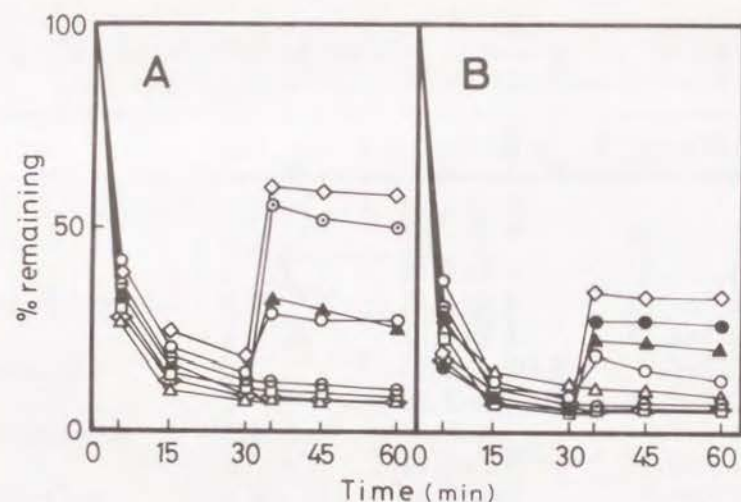


Fig.11 The Displacement of Basic Drug Accumulated in the Lung by a Second Drug  
Lungs were perfused with 0.01mM quinine(A) or imipramine(B) for 30min and then a second drug(2mM) was added to the perfusate.  
⊕, control; ⊙, imipramine; ◇, diphenhydramine; ●, quinine; ▲, metoclopramide; ○, procainamide; □, P.A.E.B.; △, sulfanilamide; ◇, sulfisoxazole.

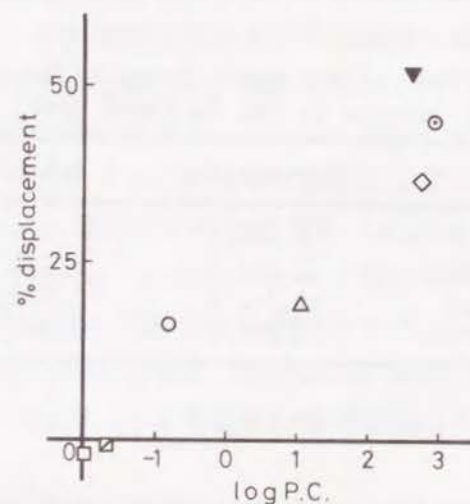


Fig.12 Relationship Between the Ability of a Second Basic Drug to Displace Quinine Accumulated in the Lung and Logarithm of the Partition Coefficient  
⊙, imipramine; ◇, diphenhydramine; ▲, metoclopramide; ▼, allocramide; ○, procainamide; ▣, N.M.N.Cl; □, P.A.E.B..

中薬物濃度に変化は認められなかった。これに対して、他の塩基性薬物を添加した時には速やかに還流液中薬物濃度が上昇した。上昇の程度は薬物間に差が認められ、添加した薬物の脂溶性に依存していた (Fig.12)。次に、この塩基性薬物

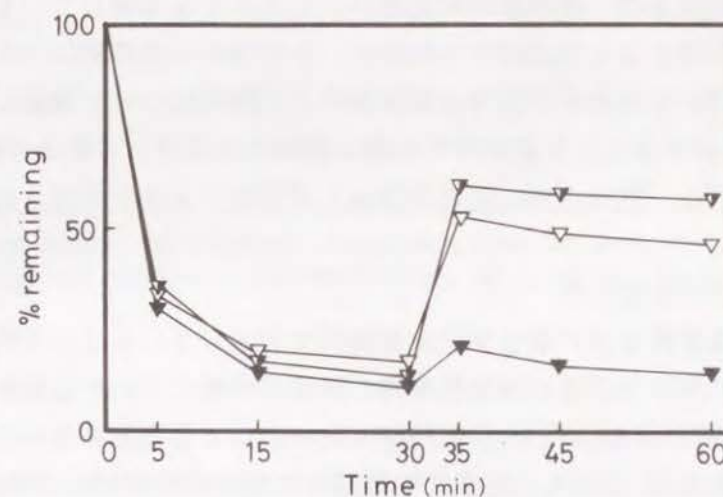


Fig.13 The Effect of Concentration of Allocramide on The Displacement of Quinine Accumulated in the Lung  
Lungs were perfused with 0.01mM quinine for 30min and then 0.2mM(▼), 0.8mM(▽), or 2mM(▽) allocramide was added to the perfusate.

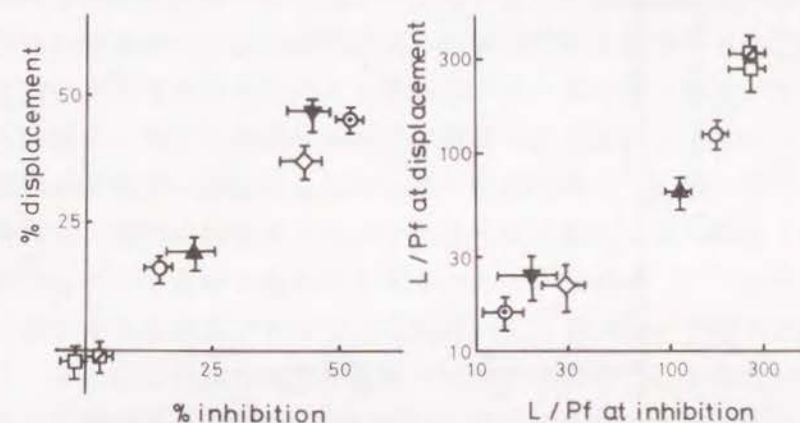


Fig.14 Relationship of Percent Displacement and Percent Inhibition of Quinine Accumulation by a Second Basic Drug  
⊙, imipramine; ◇, diphenhydramine; ▲, metoclopramide; ▼, allocramide; ○, procainamide; ▣, N.M.N.Cl; □, P.A.E.B..



添加による薬物置換現象に濃度依存性があるか否か検討した。Fig.13 に示すように、添加した第二薬物の投与量に対応して還流液中に放出される薬物量も増大した。このことは、肺組織中に蓄積していた薬物が添加した第二の塩基性薬物によって容易に置換され、還流液中に流出してくることを示唆している。この塩基性薬物の相互作用をより明確にするために、各薬物の二次添加による置換効果と Table 5, Fig.10 で求めた共存時の抑制効果との関係について検討した。その結果、Fig.14 に示すように、還流液中薬物の増加度および  $L/P_f$  の低下度とも良好な相関を示し、取り込みの障害が極めて可逆的であると予測された。

## 2-I 還流肺薬物結合性

肺における塩基性薬物の結合部位が薬物間で共通していることを明確にするために、脂溶性の異なる3種の塩基性薬物の肺結合特性について比較検討した。Fig.15 は各薬物の肺結合性を Scatchard plots したものであり、その解析値を示したのが Table 7 である。各薬物の肺結合に親和性の異なる2種類の結合部位が存在することを認めた。高親和性結合部位及び低親和性結合部位に対する各薬物の結合定数 ( $K_m$ ) は著しく異なっていたが、最大薬物結合量 ( $B_{max}$ ) はほぼ近似した値を示した。このことは、塩基性薬物に対して共通の結合部位が肺に存在することを示唆している。

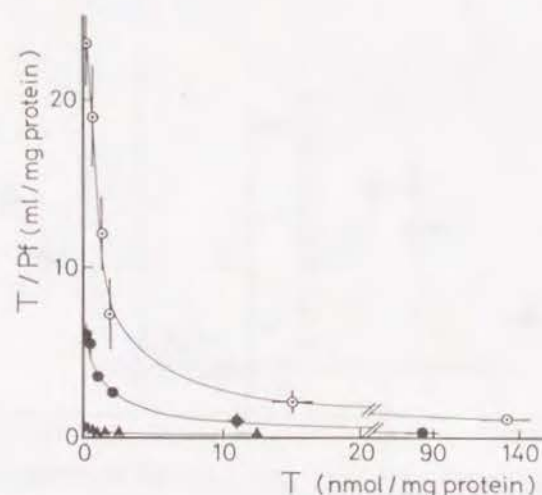


Fig.15 Scatchard Plot of Specific Binding Of Basic Drug to the Isolated Perfused Lung  
○, imipramine; ●, quinine; ▲, metoclopramide;

Table 7 Binding of Basic Drug to the Isolated Perfused Rat Lung

Drug	Affinity site	$B_{max}^a$	$K_a^b$
Imipramine	High	2.4	8.1
	Low	180	0.01
Quinine	High	2.3	1.4
	Low	130	0.007
Metoclopramide	High	2.0	0.06
	Low	280	0.0005

<sup>a</sup> Maximum number of binding sites (nmol drug/mg protein).

<sup>b</sup> Association constants for each class of binding site (1/ $\mu M$ ).

## 2-J 考 察

薬物の肺蓄積特性を解明する目的で摘出肺還流実験法を用い、物理化学的特性の異なる各種薬物の肺移行性について検討した。一般に中性・酸性薬物の還流液からの薬物消失率は低く、 $L/P_f$  が1前後となり、薬物濃度変化に対しても差の認められないことから単純拡散によって還流液より肺組織に移行するものと推察された。しかし、塩基性薬物では中性・酸性薬物に比べて還流液からの薬物移行率が高く、各薬物の肺移行率と脂溶性の間に良好な相関性を認めた。また、脂溶性の高い塩基性薬物の肺移行に濃度依存性が観察された。このことは、肺に塩基性薬物に対する特異的な取り込み機構が存在することを示唆している。この塩基性薬物の特異な肺蓄積に各種代謝阻害剤の影響は観察されなかった。還流液から消失した薬物の大半は未変化体のまま肺組織中より回収することができた。また還流液 pH の変化に対して薬物の肺移行に顕著な差が認められなかった。従って、塩基性薬物の肺蓄積に能動輸送系ならびに組織内外の pH 差に基づく薬物分配の関与は少なく、薬物の脂溶性ならびに塩基性基の有無により制御された組織成分との結合に基づいて蓄積するものと推察される。Fowler ら<sup>57)</sup> は炭素数の異なる数種の1級アルキルアミンをマウスに投与したとき、体内で速やかに代謝されたが、アミノ基と脂溶性基の両者が肺取り込みに必要なことを報告している。しかし、代謝され難い種々の薬物の *in vitro* 系での肺移行と脂溶性との関係については検討されていない。今回得られた結果は、分子中に陽電荷を有する基と高い脂溶性を有する基との両者が肺蓄積に必要なことを示している。このことは、薬物の塩基性基の有無ならびにその脂溶性から、薬物の肺移行性を予測し得るこ



とを示唆している。

さて、一方の塩基性薬物の肺蓄積が他の塩基性薬物の共存によって抑制されること、一旦取り込まれた薬物が他の塩基性薬物を灌流液に添加することによって容易に置換されること、各薬物の置換の程度と共存時の取り込み抑制の程度とが等しい値を示すこと、また還流肺における各薬物の結合性を Scatchard plots したとき結合性の異なる2種の結合部位が存在すること、両結合部位における各薬物の最大薬物結合量がほぼ近似していることを認めた。従って、肺には塩基性薬物に対する共通の結合部位が存在し、薬物の脂溶性により結合部位への親和性が制御されることが明かとなった。また塩基性薬物は互いに可逆的に結合し合うものと判断された。

### I-3 抗生物質の肺移行性

肺はガス交換を効果的に行なうために、外気と広い面積で直接接していることから、大気汚染物質による毒性発現や各種細菌等の吸入に起因する疾患の多い臓器である。またこうした特性を利用して、呼吸器感染症や心疾患等に対して、ネブライザーやエアロゾル等による投薬経路としても利用されている<sup>53-55</sup>。

体内に吸収された抗生物質は、血液やリンパ等を介して体内諸臓器に分布し、各種病原菌に作用してその薬理作用を発揮した後、一部体内変化を受けて体外に排せつされる。従って、各抗生物質の臓器内挙動を的確に把握することは、至適薬物療法を施行するうえで臨床治療上非常に重要である。

I-2において摘出還流肺薬物移行特性について検討した結果、薬物肺蓄積に陽電荷と脂溶性の両者が重要なことを明示した。しかし呼吸器疾患に広く用いられている各種抗生物質の肺移行性については未だ明確でなく、薬物の物性に基づく系統的研究が行われていないのが現状である。そこで、抗生物質の肺移行にも、先に認めた薬物肺移行特性が観察されるか否か検討した。

#### 3-A 肺蓄積性

抗生物質の肺分布特性を明かにするために、ceftazidime, tetracycline, chloramphenicol, erythromycin, leucomycin A<sub>3</sub>, 3-propionyl-leucomycin A<sub>5</sub> (P.L.M.A<sub>5</sub>) の摘出還流肺蓄積性について検討した。Fig.16 は各抗生物質を還流

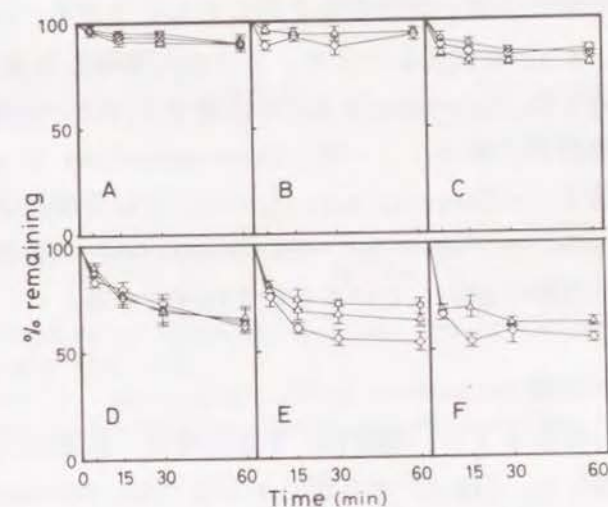


Fig.16 Time Courses of Drug Clearance from the Perfusate A, ceftazidime; B, tetracycline; C, chloramphenicol; D, erythromycin; E, leucomycin A<sub>3</sub>; F, P.L.M.A<sub>5</sub>. Initial concentration in perfusate:  $\odot$ , 2mM;  $\circ$ , 1mM;  $\triangle$ , 0.2mM;  $\diamond$ , 0.05mM.

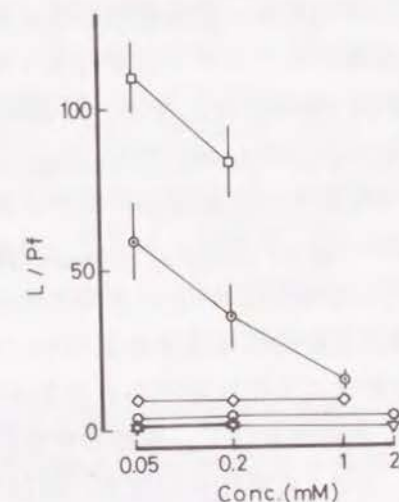


Fig.17 Concentration Ratios of Drugs in the Lung to Unbound Drug in the Perfusate after Perfusion for 60min  $\nabla$ , ceftazidime;  $\triangle$ , tetracycline;  $\circ$ , chloramphenicol;  $\diamond$ , erythromycin;  $\odot$ , leucomycin A<sub>3</sub>;  $\square$ , P.L.M.A<sub>5</sub>.



した時の還流液中薬物残存率の経時変化を示したものである。Erythromycin, leucomycin A<sub>3</sub>, P.L.M.A<sub>5</sub> を還流したとき、いずれの薬物も急速に減少し、速やかに平衡状態に移行した。Leucomycin A<sub>3</sub> および P.L.M.A<sub>5</sub> の還流液からの消失は低濃度でより一層顕著であった。一方, chloramphenicol は erythromycin に比して肺蓄積率が低く, cefalexin, tetracycline では蓄積性は認められなかった。これは cefalexin, tetracycline, chloramphenicol の脂溶性が低いこと, あるいは塩基性基の欠如に起因しているものと推察される。

### 3-B 薬物濃度の影響

抗生物質の肺移行特性をより一層明確にするために、肺蓄積に及ぼす薬物濃度の影響について検討した。Fig.17 から明らかなように、leucomycin A<sub>3</sub> および P.L.M.A<sub>5</sub> の肺蓄積は濃度の低下に伴ってより高い値を示し、濃度依存性のある蓄積機構が存在することを認めた。しかし他の抗生物質では、使用した濃度範囲で L/P f は一定となり、これら薬物の肺蓄積に濃度依存性は認められなかった。

### 3-C 代謝物の検索

抗生物質の特異な肺蓄積性を一層明確にするために、肺還流による各抗生物質の代謝について検討した。すなわち、還流液ならびに肺組織より各抗生物質及びその代謝物を抽出して、薄層クロマトグラムを行なった。Erythromycin, cefalexin, tetracycline, chloramphenicol では、肺還流液ならびに肺組織中にその代謝産物は検出されなかった (Fig.18, 19)。また leucomycin A<sub>3</sub> の場合には肺組織中に抗菌活性を有する2つの代謝産物が検出された。しかし両代謝産物のスポットは未変化体のそれに比して非常に小さく、低濃度時の回収率も 93 % と良好なことから、肺組織中の抗菌活性は主に未変化体に起因するものと判断される。一方, P.L.M.A<sub>5</sub> の場合放射活性は大きな2つのピークに分かれた。P.L.M.A<sub>5</sub> の主代謝経路は脱プロピオニル化反応であることが知られている。一般に代謝物は元の化合物に比べて水溶性が高く、薬物の肺移行性はその脂溶性によって左右されることから、P.L.M.A<sub>5</sub> 未変化体の肺移行性はさらに上昇するものと予測される。そこで、P.L.M.A<sub>5</sub> の代謝阻害剤である disofluoro-phenyl phosphate を共存させたときの肺移行率について検討した。その結果、代謝物は著しく減少したにもかかわらず、肺移行率に有意な変化は認められなかった。

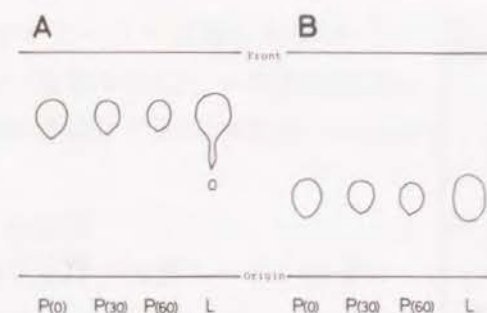


Fig.18 Bioautograms of Leucomycin A<sub>3</sub> (A) and Erythromycin (B) in Perfusate and Lung  
L, lung; P, perfusate. Drug concentration is 0.05mM.  
Numbers in parentheses refer to the sampling time (min).

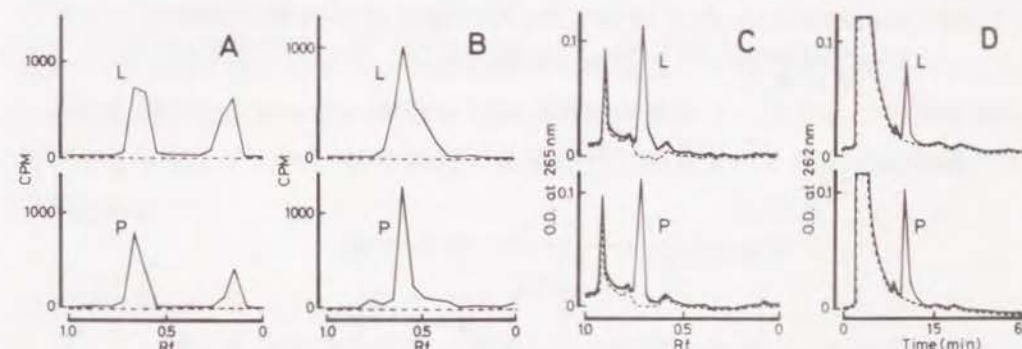


Fig.19 Chromatograms of Extracts of Perfusate and Lung after Perfusion for 60min with 0.05mM of <sup>14</sup>C-P.L.M.A<sub>5</sub> (A), <sup>3</sup>H-Tetracycline (B), Chloramphenicol (C), or Cefalexin (D)  
A, B, C, thin-layer chromatogram; D, high-pressure liquid chromatogram. L, lung; P, perfusate.  
Broken lines show samples without drug.

### 3-D 薬物脂溶性の影響

I-2において認めた陽電荷と脂溶性が薬物肺蓄積に重要であるとの知見が、抗生物質にも適応し得るか否か検討した。Fig.20 に塩基性抗生物質の肺移行率と脂溶性との関係を示した。両者の間に良好な相関性が認められた ( $r=0.973$ )。このことは他の薬物同様、抗生物質の肺蓄積に重要な影響を及ぼす要因が塩基性基と脂溶性基であることを示している。しかし I-2 で得た各薬物の肺移行率と比較して、抗生物質の方が低値を示した。今回使用した抗生物質の分子量が 440



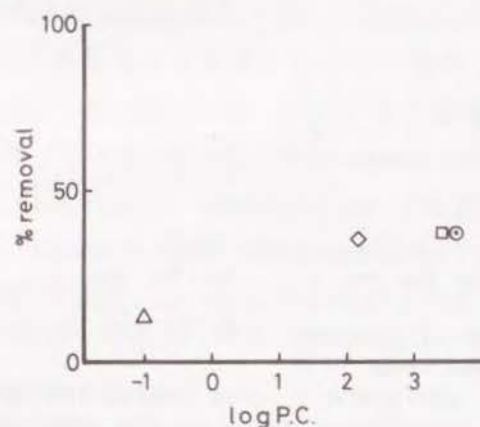


Fig. 20 Relationship of % Removal from Perfusate (at 0.2mM) and Logarithm of Partition Coefficient of Antibiotics  
 $\Delta$ , tetracycline;  $\diamond$ , erythromycin;  $\odot$ , leucomycin  $A_3$ ;  $\square$ , P.L.M.A<sub>5</sub>.

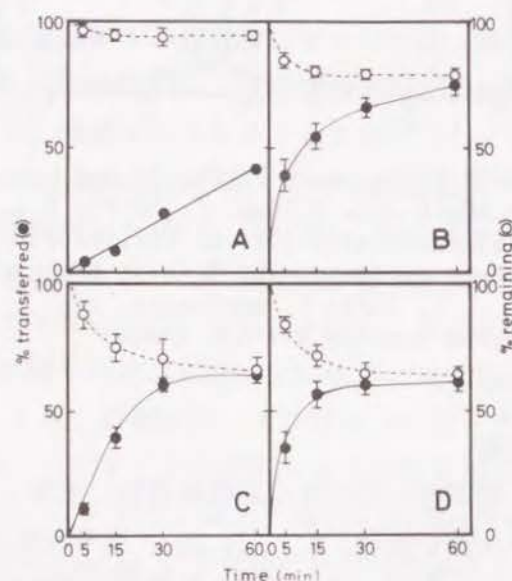


Fig. 21 Time Courses of Drug Concentration in Perfusate after Drug Administration into the Trachea (●) or Perfusate (○)  
 A, tetracycline; B, chloramphenicol; C, erythromycin; D, leucomycin  $A_3$ . Dose, 2 $\mu$ mol.

-830 であるのに対して I-2 で使用した薬物の分子量が 300 前後 (Table 1) であることから、分子量あるいは分子構造等脂溶性とは異なった、他の物理化学的要因が塩基性薬物肺蓄積に一部関与しているためではないかと推察される。

### 3-E 投薬ルートの影響

抗生物質の肺蓄積に及ぼす投薬ルートの影響について検討した。Fig. 21 は leucomycin, chloramphenicol, tetracycline を各々還流肺の気管内投与した時の、還流液中薬物濃度を経時的にプロットしたものである。Leucomycin  $A_3$  は急速に還流液中に出現し、15 分以内に平衡状態に達した。この時、肺胞から還流液への薬物移行率は 3-A で得た薬物残存率とほぼ等しい値を示した。Erythromycin 及び chloramphenicol は、leucomycin  $A_3$  に比べて緩やかに移行し、各々 30 分及び 60 分後に平衡状態に達した。しかし tetracycline は 60 分後においても平衡状態に達せず、一部の薬物は肺胞および気管内に残存していた。これらの成績は脂溶性の高い薬物ほど肺透過性が良好で、速やかに平衡状態に達することを示唆しており、抗生物質の肺蓄積性に投薬ルートの影響は皆無であると判断される。

### 3-F 考 察

I-2 で得た薬物肺移行特性の成績が抗生物質の肺移行にも適応し得るか否か、ラット摘出肺還流実験法を用いて検討した結果、肺感染疾患に広く用いられている leucomycin  $A_3$ , erythromycin は摘出還流肺に高い蓄積性を示した。両薬物とも脂溶性が高く塩基性基を有していた。一方、脂溶性の低い tetracycline ならびに非塩基性の chloramphenicol では特異な蓄積は認められなかった。また、還流肺の気管内に薬物を投与した場合、薬物肺透過性に脂溶性が関与しており、平衡状態時の薬物肺蓄積率も還流液からの薬物取り込み率とほぼ等しい値を示した。このことは、抗生物質の肺蓄積に及ぼす投薬ルートの影響が非常に小さいことを示唆している。これらの成績は、I-2 で認めた肺蓄積に対する塩基性基と脂溶性基の重要性を支持するものであり、薬物一般の肺移行性について適応し得ることを示唆している。これらの知見は呼吸器疾患に対する抗生物質療法を施行する上で、また肺への drug delivery system を開発する上で有益な示唆を与えるものと推察される。



## 第II章 肺細胞内における薬物局在性

血中薬物濃度を指標とする薬物投与計画が臨床治療上注目され、多方面より検討されている。しかし薬効を左右するのは標的臓器中の薬物であり、臓器中の薬物濃度及びその細胞内分布特性を的確に把握することは、至適薬物療法を施行する上で非常に重要である。前章において、脂溶性の高い塩基性薬物が還流液より速やかに肺組織に移行して、細胞成分と特異的に結合し、血中よりも非常に高い組織中薬物濃度を示すことを明らかにした。

本章では、塩基性薬物の特異な肺蓄積をよりミクロな観点から考察するために、薬物蓄積した肺の細胞成分分画を行ない、細胞内における塩基性薬物の特異的な蓄積器官について精査した。また親和性の高い細胞内小器官の薬物結合特性について詳細に検討し、肺細胞内における塩基性薬物の特異的な蓄積部位について解明を試みた。

### II-1 還流肺の細胞成分分画

細胞成分分画法による薬物の細胞内局在性に関する研究は古く、薬物分布と薬効、代謝、毒性等の観点より種々検討されている。すなわち、ステロイドホルモンは細胞内の核部分に移行してDNAと特異的に結合し、蛋白合成に影響を及ぼす<sup>63)</sup>。ペプチドホルモンは主に標的臓器の細胞膜に結合して効果発現刺激を与えた後、internalizationによって細胞内に取り込まれ、ライソゾームに移行して代謝分解される<sup>64)</sup>。また強心配糖体は心筋ミクロソームに特異的に蓄積して、代謝機能を賦活化することによって薬効を発揮する<sup>65)</sup>ことは広く知られている。

本章では、この肺内薬物蓄積部位をより詳細に検討するために、還流肺細胞成分分画を行ない、薬物の細胞内局在部位の解明を行なった。

#### 1-A 細胞成分分画法の検討

細胞成分分画を行なう場合、ホモジネートの作成方法、添加溶液の組成、分画容器の形状、遠心機器、遠心条件等により、各画分に含まれる主要細胞内小器官の分布が著しく異なることが知られている<sup>66)</sup>。従って、細胞成分分画を行なう場合、使用する分画条件での各画分の純度、ならびに他の細胞内小器官の混入の

程度を把握しておく必要がある。そこで細胞成分の分離状況を把握するために、各画分における細胞内小器官の指標酵素活性を測定した。なお指標酵素として、ミトコンドリアについてはモノアミン酸化酵素(MAO)およびチトクロム酸化酵素を、細胞膜については5'-ヌクレオチダーゼを、ミクロソームについてはグルコース-6-ホスファターゼを、またライソゾームについては酸ホスファターゼを用いた。Fig.22は薬物還流肺の分画結果を示したものである。600xg画分では核および未破壊細胞・組織片が含まれているため、各指標酵素の活性は特異性を示さず全て1以下であった。チトクロム酸化酵素およびMAO活性は3,300xg画分で高くホモジネートの約5.5倍高値を示した。しかし、同画分における他の酵素活性は低く、1前後であった。5'-ヌクレオチダーゼ、グルコース-6-ホスファターゼ、酸ホスファターゼ活性は192,000xg画分で高値を示した。これら指標酵素の分布様式に、薬物還流肺と未還流肺の間に差は認められなかった。Hookら<sup>67)</sup>は、各画分が各々次の細胞成分にほぼ対応していることを報告している。すなわち、600xg画分(第1画分)は核・未破壊細胞・結合組織、3,000xg画分(第2画分)は重ミトコンドリア、10,000xg画分(第3画分)は軽ミトコンドリア、192,000xg画分(第4画分)はミクロソーム・ライソゾーム、

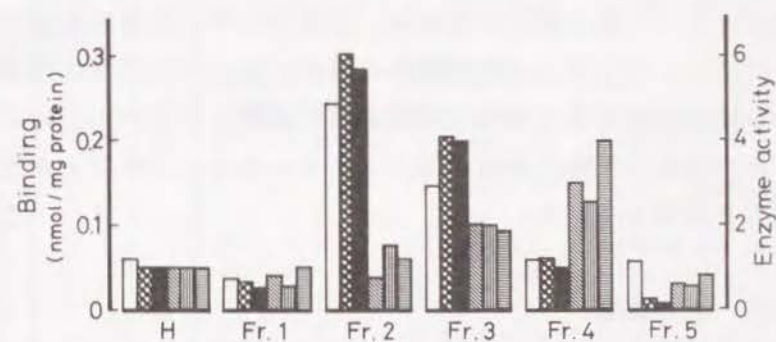


Fig.22 Subcellular Distribution of Quinine and Marker Enzymes in Homogenates from the Perfused Rat Lung  
□, quinine; ▨, cytochrome oxidase; ■, monoamine oxidase; ▤, 5'-nucleotidase; ▥, acid phosphatase; ▩, glucose-6-phosphatase.  
H, homogenate; Fr.1, 600xg pellet; Fr.2, 3000xg pellet; Fr.3, 10000xg pellet; Fr.4, 192000xg pellet; Fr.5, cytosol.  
Enzyme activity: the ratio of enzyme activity in each subcellular fraction to that in the homogenate (normalized to protein content).



192,000xg 上清 (第5画分) はサイトゾルである。各画分中指標酵素の分離パターンならびに比活性は, Hook らの結果とほぼ対応していた。以上のことから, 今回用いた分画法は薬物還流により影響を受けることなく, 肺の細胞内小器官を特異的に分離するのに適した方法であると考えられる。

### 1-B 塩基性薬物の細胞内局在性

塩基性薬物の肺細胞内結合部位について精査するため, quinine 還流肺のホモジネートを作成し, 細胞成分分画を行なった後, 各画分への薬物分布率ならびに薬物蛋白結合量を測定した。結果を Table 8 および Fig.22 に示した。1 $\mu$ M 還流時, 肺に蓄積した quinine のうち 83 % が細胞内小器官に結合していた。ホモジネート中 quinine の大半は第1画分と第2画分に結合していたが, 蛋白当たりの薬物結合量は, 第2画分が他の画分に比べて最も高い値を示した。第5画分には約 17 % の薬物が含まれていたが, 蛋白当たりの薬物結合量は全画分中最も低い値を示した。Imipramine の細胞内分布は quinine のそれと同様のパターンを示したが, 第2画分への蓄積特異性では quinine よりも優れていた。一方, metoclopramide では肺ホモジネート中薬物の 39 % が第5画分 (サイトゾル) に分布していたが, 約 35 % は遊離型であった。従って, 第5画分には特異的な薬物結合は認められず, 第2画分が最も高い値を示した。塩基性薬物の各画分への分布パターンはミトコンドリア指標酵素の分布パターンと非常に密接な関係を示した。しかし他の指標酵素との間には関連性は認められなかった。これらの結果は, 肺組織中の塩基性薬物主要結合部位として, ミトコンドリアが重要な役割を担っていることを示している。

### 1-C 投薬ルートの影響

塩基性薬物の細胞内分布特性を解明するために投薬ルートの影響について検討した。Fig.23 は quinine を還流液または気管内に投与し, 1時間還流した肺の細胞成分分画を示したものである。気管内投与した時, 薬物結合量は第2画分が最も高く, 次いで第3, 第4画分の順となり, 還流液内に投与した場合と同様の分布パターンを示した。また酵素分布もほぼ等しい分布パターンを示した。従って, 肺が intact な状態を維持している場合, 肺胞側から透過した薬物, および血管側から移行した薬物は, いずれも肺組織中の同一部位に結合するものと推察され, 肺内の塩基性薬物移行に方向性のないことが予測された。

Table 8 Subcellular Distribution of Drugs in Isolated Perfused Rat Lung

Drug conc. ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	Fraction No. <sup>#</sup>	Percentage distribution			Binding (nmol/mg protein)		
		IMI*	QUI*	MET*	IMI*	QUI*	MET*
1	1	28.3 $\pm$ 4.5	31.5 $\pm$ 3.9	25.7 $\pm$ 3.5	0.059 $\pm$ 0.003	0.065 $\pm$ 0.005	0.022 $\pm$ 0.001
	2	35.5 $\pm$ 3.2	31.2 $\pm$ 4.6	18.7 $\pm$ 2.0	0.436 $\pm$ 0.012	0.350 $\pm$ 0.042	0.075 $\pm$ 0.007
	3	11.9 $\pm$ 0.4	10.2 $\pm$ 1.8	5.6 $\pm$ 0.5	0.213 $\pm$ 0.021	0.216 $\pm$ 0.033	0.034 $\pm$ 0.002
	4	9.9 $\pm$ 1.0	7.8 $\pm$ 0.9	3.8 $\pm$ 0.5	0.108 $\pm$ 0.009	0.084 $\pm$ 0.008	0.015 $\pm$ 0.002
	5	9.4 $\pm$ 2.8	16.9 $\pm$ 1.1	39.2 $\pm$ 1.3	0.032 $\pm$ 0.004	0.058 $\pm$ 0.004	0.041 $\pm$ 0.001
10	1	30.3 $\pm$ 7.2	33.1 $\pm$ 3.3	27.6 $\pm$ 4.0	0.64 $\pm$ 0.03	0.60 $\pm$ 0.05	0.24 $\pm$ 0.02
	2	30.7 $\pm$ 3.5	27.4 $\pm$ 4.0	19.8 $\pm$ 2.1	3.66 $\pm$ 0.67	2.61 $\pm$ 0.34	0.78 $\pm$ 0.03
	3	12.0 $\pm$ 1.9	10.6 $\pm$ 1.2	5.4 $\pm$ 1.3	1.69 $\pm$ 0.22	1.59 $\pm$ 0.21	0.37 $\pm$ 0.01
	4	11.7 $\pm$ 2.0	10.2 $\pm$ 0.8	4.4 $\pm$ 0.4	1.11 $\pm$ 0.19	0.76 $\pm$ 0.09	0.18 $\pm$ 0.01
	5	11.5 $\pm$ 0.1	17.8 $\pm$ 1.4	44.0 $\pm$ 3.0	0.35 $\pm$ 0.01	0.46 $\pm$ 0.04	0.47 $\pm$ 0.03
200	1	31.9 $\pm$ 2.9	33.6 $\pm$ 5.5	27.3 $\pm$ 2.6	11.4 $\pm$ 1.2	9.3 $\pm$ 0.5	4.1 $\pm$ 0.3
	2	22.1 $\pm$ 2.2	21.5 $\pm$ 0.3	14.8 $\pm$ 2.2	35.4 $\pm$ 3.3	26.7 $\pm$ 1.7	9.1 $\pm$ 1.0
	3	10.7 $\pm$ 1.2	7.8 $\pm$ 0.5	4.6 $\pm$ 0.5	29.3 $\pm$ 4.0	16.0 $\pm$ 1.7	4.9 $\pm$ 0.6
	4	15.4 $\pm$ 2.0	11.2 $\pm$ 0.9	4.2 $\pm$ 0.7	22.6 $\pm$ 2.7	11.9 $\pm$ 1.5	2.8 $\pm$ 0.3
	5	15.1 $\pm$ 1.7	21.9 $\pm$ 0.2	42.4 $\pm$ 1.4	7.1 $\pm$ 1.0	8.2 $\pm$ 0.9	8.3 $\pm$ 0.4

<sup>a</sup> Initial drug concentration in perfusate.

<sup>#</sup> Fraction 1, 600xg pellet; Fraction 2, 3,000xg pellet; Fraction 3, 10,000xg pellet; Fraction 4, 192,000xg pellet; Fraction 5, cytosol.

\* IMI, imipramine; QUI, quinine; MET, metoclopramide.



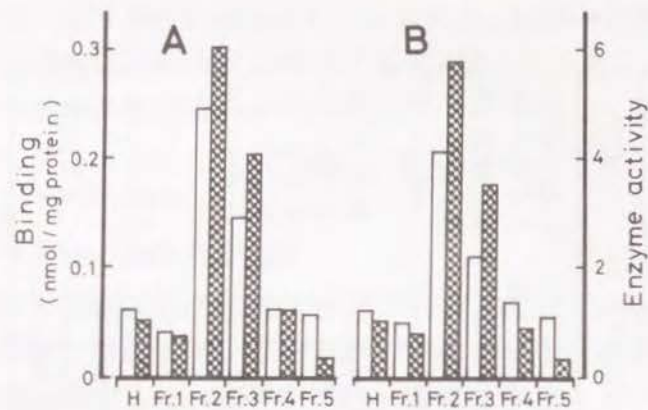


Fig.23 Subcellular Distribution of Quinine(□) and Cytochrome Oxidase(▨) in Homogenates from the Perfused Lung  
A, quinine was administered into the perfusate.  
B, quinine was administered into the trachea.  
Dose, 10nmol.

#### 1-D 薬物濃度の影響

肺に蓄積した塩基性薬物の細胞内分布特性を更に明確にするために、各画分への薬物分布に及ぼす薬物濃度の影響について検討した。Table 8, Fig.24 に示す様に、使用したいずれの塩基性薬物も、ミトコンドリア画分に最も特異性の高い蓄積を示した。一方、サイトゾルならびにミクロソーム画分の薬物結合量は僅かであった。ミトコンドリア画分への imipramine の蓄積は各濃度とも他の薬物に比べて最も高く、顕著な濃度依存性を示した。Quinine の分布もまた imipramine と同様のパターンを示した。しかし metoclopramide の分布では、他の薬物ほど顕著な濃度依存性を示さなかった (Fig.25 A)。これらの結果は、肺の特異な薬物蓄積現象がミトコンドリアの薬物結合特性にも同様に認められることを示すと共に、塩基性薬物の肺蓄積にミトコンドリアが密接に関与していることを示唆している。

#### 1-E 薬物脂溶性の影響

ミトコンドリア画分への薬物分布特性をより一層明確にするために、肺細胞内小器官への薬物分布に及ぼす薬物脂溶性の影響について検討した。Fig.25 B は各薬物のミトコンドリア画分への相対的蓄積率とその脂溶性との関係を示したも

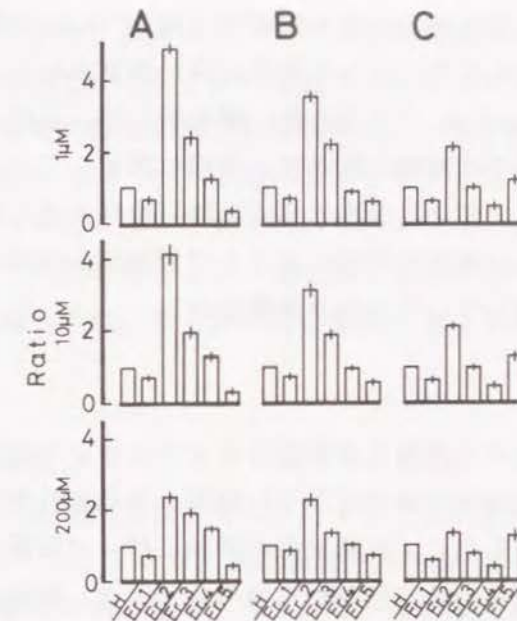


Fig.24 Effect of Initial Drug Concentration in the Perfusate on Subcellular Distribution of Basic Drugs in Homogenates from the Perfused Rat Lung  
A, imipramine; B, quinine; C, metoclopramide.  
Ratio: the ratio of drug accumulation in each subcellular fraction to drug present in the homogenate(normalized to protein content).

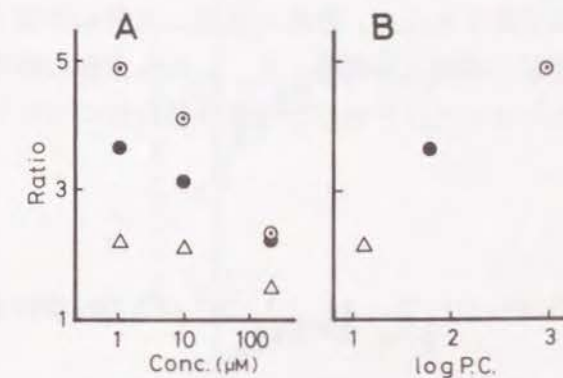


Fig.25 Effect of Initial Drug Concentration(A) and Lipid Solubility (B) on Mitochondria Distribution of Basic Drugs in the Perfused Lung  
○, imipramine; ●, quinine; △, metoclopramide.



のである。使用した塩基性薬物中最も脂溶性の高い imipramine のミトコンドリア画分への蓄積は、他の薬物に比して著明に高い値を示した。これに対して、脂溶性の低い metoclopramide では最も低い値を示した。このことは、ミトコンドリアへの薬物蓄積が個々の薬物の脂溶性と密接に関連していることを示している。これらの知見は I-2 で認めた薬物の還流肺移行特性と良く対応していることから、ミトコンドリアには塩基性薬物に対する特異的結合部位が存在し、塩基性薬物の貯蔵庫として機能しているものと推察される。

## I-F 考 察

塩基性薬物の肺組織中の特異な蓄積部位をよりミクロな観点から検討するために、薬物還流肺の細胞成分分画を行なった結果、各塩基性薬物とも、ミトコンドリア画分への蓄積が最も高く、薬物濃度の増加に伴って同画分への移行率が減少した。薬物を血管側あるいは気管側から投与したとき、細胞内薬物分布には変化はみられなかった。また脂溶性の高い薬物ほどミトコンドリア画分への分布量が多く、両者の間に良好な相関性が認められた。これらの結果は先の還流肺で認められた結果と対応していることから、肺における塩基性薬物蓄積部位としてミトコンドリアが重要な役割を担っているものと推察される。

Schneck ら<sup>68)</sup>は $\beta$ -ブロッカーである propranolol が肺ミクロソーム及びミトコンドリア画分に蓄積し易いことを報告している。また Minchin ら<sup>69)</sup>は chlorphentermine が肺ミクロソーム画分に移行し易いことを示している。これらの成績は実験方法が異なるため、著者の成績と同等に評価することは出来ないが、今回得られた著者の成績より判断して、これら薬物の脂溶性ならびに濃度依存性の観点より、ミトコンドリア画分への薬物移行性について精査する必要があると判断される。

## II-2 ミトコンドリアの薬物結合性

ミトコンドリアが塩基性薬物の肺細胞内蓄積部位として重要な役割を演じていることを II-1 で明らかにした。Huunan-Seppala<sup>70)</sup>は肝ミトコンドリア膜の propranolol ならびに chlorpromazine の結合性について、また Bickel ら<sup>71)</sup>は各細胞成分の薬物結合能について報告しているが、それらの報告は肝ミトコンド

リアに関するものであり、肺ミトコンドリアの薬物結合特性に関する詳細な検討は、未だ十分行なわれていない。肺は心臓から拍出された血液のほぼ全量が循環しており、血液中異物の除去器官として機能している。従って、肺ミトコンドリアの塩基性薬物結合特性について詳細に検討することは、薬物の薬効・毒性発現機構を解明する上で非常に重要と考えられる。そこで、塩基性薬物蓄積部位としてのミトコンドリアの重要性をより一層明確にするために、肺ミトコンドリアに対する各種薬物の結合特性、ならびに結合薬物に及ぼす他の薬物の影響について検討した。

## 2-A 実験条件の検討

ミトコンドリアの薬物結合性を明らかにするために至適実験条件について検討した。Fig. 26 はミトコンドリアと各種塩基性薬物を 37℃ でインキュベートした時の、溶媒中薬物濃度に対するミトコンドリア結合量 (P/M) の経時変化を示したものである。反応開始後、P/M は速やかに上昇し、2.5 分で最大値に達した後、ほぼ平衡状態を維持するかまたは僅かな減少傾向を示した。各薬物ともミトコンドリアに速やかに結合し、ほぼ同様のパターンを示した。従って、反応時間を 2.5 分として以下の実験を行なった。

ミトコンドリアの安定性をみるために、調製直後、1 日、2 日及び 3 日後のミトコンドリアを用いて結合実験を行なった。ミトコンドリアの薬物結合能は実験

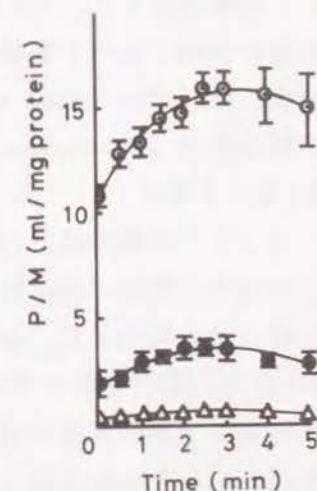


Fig. 26 Time Courses of Drug Binding to Rat Lung Mitochondria  
○, imipramine; ●, quinine; △, metoclopramide.



開始直前に調製したものが最も高く、保存期間の延長に伴って著明に低下した (Fig.27)。従って、薬物結合実験施行直前に調製したミトコンドリアを用いて、以下の実験を行なった。

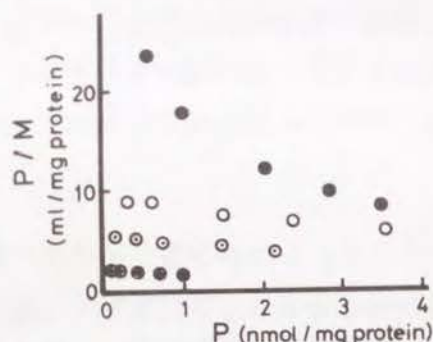


Fig.27 Effect of Storage period on the Binding of Imipramine to Rat Lung Mitochondria  
Binding experiments were performed immediately (●), 1day (○), 2day (⊙), or 3day (⊕) after lung mitochondria was prepared.

## 2-B 薬物結合性

肺ミトコンドリアにおける薬物結合特性を明らかにするために、各種薬物のミトコンドリアとの結合性について比較検討した。Fig.28 から明らかなように、imipramine および quinine は他の薬物に比べて容易に結合した。しかし、中性・酸性薬物である sulfanilamide, phenylbutazone はミトコンドリアに蓄積性を示さなかった。塩基性薬物の結合性は imipramine, quinine, metoclopramide, procainamide, N.M.N.Cl の順に低下した。

次に、各薬物の脂溶性とミトコンドリア結合性との関係について検討した。塩基性薬物のミトコンドリア結合はそれら薬物の脂溶性と良く相関しており ( $r=0.957$ )、脂溶性の上昇に伴って結合量も増加した。しかし、脂溶性の高い酸性薬物の phenylbutazone には特異な蓄積は観察されなかった。

ミトコンドリアの薬物結合性に及ぼす薬物濃度の影響について検討した。Fig.29 は薬物結合量を Scatchard plots したものであり、その解析値を Table 9 に示した。いずれも非直線性を示し、結合様式の異なる2種類以上の結合部位、すなわち親和性が高く結合部数の少ない部位と、親和性が低く結合部数の多い部

位が存在することを認めた。各薬物の結合部数は薬物間で互いに近似した値を示したが、結合定数は著しく異なり、脂溶性の高い薬物ほど高値を示した。各薬物の結合定数とその脂溶性との間に相関が認められた。

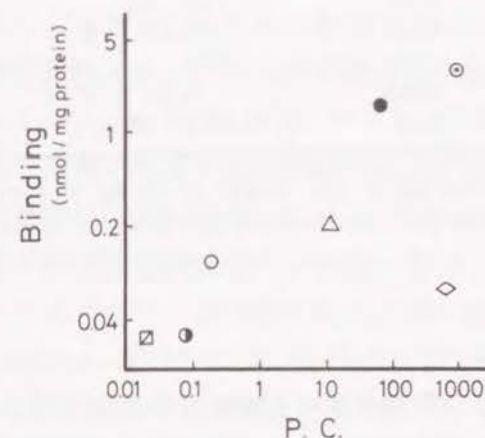


Fig.28 Effect of Lipid Solubility on Drug Binding to Lung Mitochondria  
⊙, imipramine; ●, quinine; △, metoclopramide; ○, procainamide; □, N.M.N.Cl; ⊙, sulfanilamide; ◇, phenylbutazone.

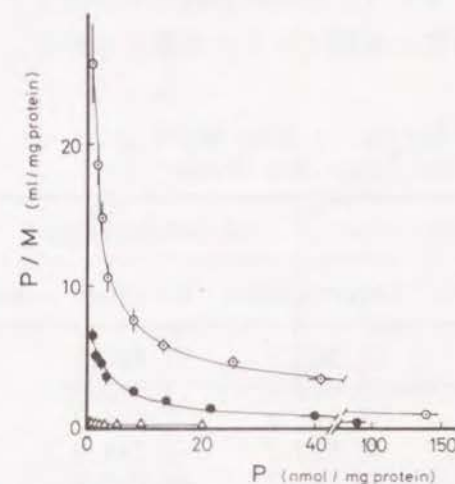


Fig.29 Scatchard Plot of Specific Binding of Basic Drug to Rat Lung Mitochondria  
⊙, imipramine; ●, quinine; △, metoclopramide.



Table 9 Binding of Basic Drugs to the Rat Lung Mitochondrial Pellet

Drug	Affinity site	Bmax <sup>a</sup>	Ka <sup>#</sup>
Imipramine	High	4.7±0.05	8.4 ±2.5
	Low	155 ±12	0.030 ±0.005
Quinine	High	4.2±0.6	1.2 ±0.1
	Low	135 ±7	0.014 ±0.002
Metoclopramide	High	3.5±1.0	0.013 ±0.001
	Low	254 ±48	0.0009±0.0001

<sup>a</sup> Maximum number of binding sites (nmol drug/mg protein).<sup>#</sup> Association constants for each class of binding site (1/μM).

## 2-C 共存薬物の影響

ミトコンドリアの薬物結合特性を更に明確にするため、ミトコンドリア薬物結合に及ぼす塩基性薬物の相互作用について検討した。Table 10 に imipramine, quinine, metoclopramide のミトコンドリア結合に及ぼす各種薬物の影響を示した。各薬物とも、非塩基性薬物及び脂溶性の低い塩基性薬物による影響は無視し得る程度であった。これに対して、脂溶性の高い塩基性薬物を共存させたとき、阻害効果が認められた。使用した共存薬物中最も脂溶性の高い diphenhydramine は最も強い阻害効果を有しており、各共存薬物のミトコンドリア薬物結合に対する阻害効果は各薬物の脂溶性と相関することが認められた。

Table 10 The Inhibition of Drug Binding to the Mitochondria by Various Competing Drugs

Inhibitor	% inhibition		
	Imipramine	Quinine	Metoclopramide
Diphenhydramine	32.1±2.9	37.4±3.9	29.3±2.0
Metoclopramide	19.6±1.7	17.8±2.3	15.0±2.6
Procainamide	8.6±5.4	6.5±4.7	3.0±4.0
N.M.N.Cl	-0.1±3.1	-4.7±2.6	0.4±3.2
Sulfanilamide	3.2±2.7	-5.0±2.8	-2.4±3.5
Phenylbutazone	-2.5±3.0	2.8±2.5	0.2±2.8

Mitochondrial pellets were incubated with a mixture of 2nmol of a basic drug and 100μM of inhibitor.

そこで更にミトコンドリアの塩基性薬物結合に及ぼす他の塩基性薬物の阻害様式について検討した。Fig.30 A, B は diphenhydramine または metoclopramide 共存時の quinine のミトコンドリア結合性を Lineweaver-Burk plots したものである。Diphenhydramine 濃度の上昇に伴い、ミトコンドリアの quinine 結合量が著しく減少した。しかし、いずれの濃度においても、quinine のミトコンドリア結合は良好な直線性を示し、各々の直線は垂直座標の同一点で交差した。このことは、diphenhydramine が quinine のミトコンドリア結合を競合阻害することを示している。同様の現象が metoclopramide の共存においても認められた。しかし、その阻害効果は diphenhydramine の方がより顕著であった。従って、各薬物の阻害効果の相違は薬物脂溶性の相違に基づくものと推察される。この点をより一層明確にするために、脂溶性の極めて低い塩基性薬物の N.M.N.Cl を共存させたときの quinine 結合性について検討した。Fig.30 C から明らかなように、N.M.N.Cl による阻害効果は観察されなかった。次に、ミトコンドリア薬物結合に薬物が陽性荷電を有することの重要性を明確にするために、脂溶性の高い酸性薬物である phenylbutazone を共存させて同様の実験を行なった。しかし、N.M.N.Cl の場合と同様、阻害効果は認められなかった (Fig.30 D)。これらの

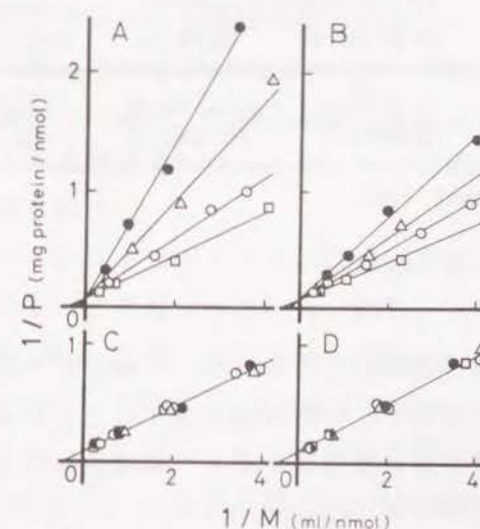


Fig.30 Lineweaver-Burk Plots of Quinine Binding to Rat Lung Mitochondria in the Presence or Absence of Diphenhydramine(A), Metoclopramide(B), N.M.N.Cl(C) or Phenylbutazone(D)  
Drug concentration: □, 0μM; ○, 5μM; △, 15μM; ●, 50μM.



結果は、薬物のミトコンドリア結合にも薬物脂溶性ならびに塩基性基の保持が重要なことを示唆している。この塩基性薬物相互の阻害効果ならびに阻害効果発現のための薬物脂溶性及び塩基性基の重要性は、imipramine, metoclopramide のミトコンドリア結合にも同様に認められた。また imipramine, quinine, metoclopramide のミトコンドリア結合性を Lineweaver-Burk plots した時、各薬物の垂直軸切片は何れも同一点で交差したことから、各塩基性薬物は同一の結合部位に結合し、互いに競合的に抑制し合うことを示している。これら薬物の阻害定数を Table 11 に示した。各塩基性薬物とも、ミトコンドリア結合に対する阻害効果は、metoclopramide に比し、diphenhydramine の方がより顕著であった。また、各共存薬物共 imipramine 結合に対する阻害効果が最も大きく、次いで quinine, metoclopramide の順に低下した。このことは、脂溶性の高い塩基性薬物ほどミトコンドリア結合に対して、他の塩基性薬物の影響を受け易いことを示している。

Table 11 Effect of a Second Basic Drug on the Accumulation of a Basic Drug in the Mitochondrial Pellet

Inhibitor	K <sub>i</sub> <sup>*</sup>		
	Imipramine	Quinine	Metoclopramide
Diphenhydramine	1.3±0.1	5.3±0.4	39.5±10.1
Metoclopramide	3.5±0.3	16.3±2.3	54.5±12.0

\* Inhibition constant (μM).

## 2-E 考 察

肺ミトコンドリアの塩基性薬物結合特性について検討した結果、各薬物とも速やかにミトコンドリアに結合して、平衡状態に達することを認めた。ミトコンドリアの薬物結合量は脂溶性の高い薬物ほど多く、濃度依存性を示した。この塩基性薬物のミトコンドリア蓄積性を Scatchard plots した結果、親和性の異なる2種以上の結合部位の存在を認めた。各薬物に対する最大薬物結合数は、薬物間ではほぼ近似した値を示したが、結合定数は薬物間で大きく異なり、薬物脂溶性との間に良好な相関を認めた。またミトコンドリアへの塩基性薬物結合は、他の塩基性薬物の共存により競合的に阻害された。その抑制効果は薬物の脂溶性と密接

に関連しており、また共存薬物濃度に依存していた。これらの成績は還流肺で得られた結果と良く一致していることから、塩基性薬物の肺内蓄積部位として、ミトコンドリアが重要な役割を担っていると推察される。また薬物のミトコンドリア結合性から薬物の肺移行性を予測することが可能なことから、ミトコンドリア薬物結合実験は、薬物の肺蓄積性を研究するためのスクリーニング法として、非常に有用であると考えられる。

Minchin ら<sup>69)</sup>は平衡透析法 (37℃, 3時間) による肺ミトコンドリア画分 (15, 000xg, 15分) の chlorphentermine の結合特性について検討し、結合パラメーターが  $K_a = 2.01 \text{ mM}^{-1}$ ,  $V_{\max} = 108 \text{ nmol/mg protein}$  であったと報告している。Chlorphentermine の脂溶性が metoclopramide のそれと近似しており、chlorphentermine に対する両パラメーターが metoclopramide の低親和性部位に対する値と類似していた。しかし、彼らは chlorphentermine に対する高親和性部位を検出していない。検出できない要因については明確ではないが、ミトコンドリアの精製度、新鮮度あるいは実験条件などの相違に起因するものと推察される。

Nishiura ら<sup>72)</sup>は平衡透析法 (4℃, 48時間) による各種肺細胞成分画分のキニジン結合性について検討し、ミトコンドリア高親和性結合部位の  $K_a$  が  $0.14 \text{ } \mu\text{M}^{-1}$  であり、ミクロゾーム画分のそれに比して低いことを報告している。キニジンはキニーネの立体異性体であり同等の脂溶性を有しているにも拘らず、この値は著者のキニーネの値に比して1/9と著明に低い。Fig.28 に示すようにミトコンドリア画分を冷蔵保存した場合、日時の経過にともない薬物結合性が低下することから Nishiura らの実験条件ではミトコンドリアの薬物結合特性を十分に把握できないものと推察される。

Bickel ら<sup>71)</sup>はラット肝ミトコンドリアには高脂溶性の塩基性薬物に対して2種の結合部位が存在することを報告している。即ち、imipramine の結合に対する高親和性部位の  $K_a$ ,  $B_{\max}$  は各々  $0.22 \text{ } \mu\text{M}^{-1}$ ,  $88 \text{ nmol/mg protein}$  であり、chlorpromazine のそれは  $0.058 \text{ } \mu\text{M}^{-1}$ ,  $211 \text{ nmol/mg protein}$  であった。これらの値は今回ラット肺ミトコンドリアについて得た値と著しく異なっている。著者はラット肝ミトコンドリアを用いた予備実験で imipramine に対する結合パラメーターが Bickel らの値と類似していることを認めたことから、結合パラメーターの相違は実験条件の相違よりはむしろ、使用臓器の相違に起因するものと考えられる。薬物蓄積性がなぜ臓器間で著しく異なるのか未だ明確ではないが、この問題を解決するための糸口が肺ミトコンドリアに隠されているものと推察される。



## II-3 ミトコンドリア内における薬物局在性

ミトコンドリアが塩基性薬物の肺蓄積部位として重要な役割を担っていることをII-1, 2で明らかにした。

さて、ミトコンドリアは内外二重の膜で覆われた細胞内小器官であり、電子伝達系を介して生命活動に必要な生体内エネルギーを生成している重要な器官である。従って、ミトコンドリア内の塩基性薬物局在部位をより詳細に検討することは、薬効・毒性など生体に及ぼす薬物の影響を把握する上で極めて重要である。そこで塩基性薬物の蓄積した肺ミトコンドリアを更に細分画し、蓄積部位の解明を試みた。

### 3-A ミトコンドリアの細分画

薬物還流肺より得たミトコンドリア画分を細分画した。Greenawalt らはジグトニン法<sup>73)</sup>によりミトコンドリアを細分画したとき各画分が各々次の成分に対応すると報告している。すなわち、12,000xg 画分 (第1画分): 未破壊ミトコンドリアおよびミトコンドリア内膜, 105,000xg 画分 (第2画分): ミトコンドリア外膜, 105,000xg 上清 (第3画分): ミトコンドリア膜間スペース及びマトリックスである。Fig.31 に示す様に、ミトコンドリア内膜の指標酵素であるチトクロム酸化酵素の特異活性は第1画分で、ミトコンドリア外膜の指標酵素であ

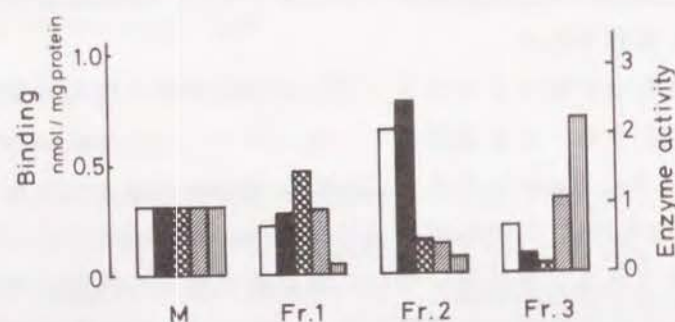


Fig.31 Distribution of Quinine and Marker Enzymes in Mitochondria from the Perfused Lung  
□, quinine; ■, monoamine oxidase; ▨, cytochrome oxidase;  
▩, sulfite cytochrome C reductase; ▤, malate dehydrogenase.  
Mit, mitochondrial fraction; Fr.1, 12,000xg pellet;  
Fr.2, 105,000xg pellet; Fr.3, 105,000xg supernatant.

るモノアミン酸化酵素 (MAO) は第2画分で、またミトコンドリア膜間スペースの指標酵素であるマレイン酸脱水素酵素及びマトリックスの指標酵素である亜硫酸チトクロムC還元酵素は第3画分で各々高値を示した。還流肺及び非還流肺から得たミトコンドリア間でこれら酵素の分布様式に差はみられなかった。これらの成績は今回用いたミトコンドリア画分の細分画法が肺ミトコンドリア内薬物分布を研究する上で適した方法であることを示している。Table 12 は還流肺に蓄積した薬物の亜ミトコンドリア画分への分布を示したものである。ミトコンドリア内に取り込まれた quinine の大半は第1及び第2画分に結合していた。しかし蛋白当たりの薬物蓄積量は第2画分が最も多く、他の画分のそれに比して約3倍高値を示した。Imipramine のミトコンドリア内分布も quinine の場合と類似していた。しかし第2画分への imipramine の蓄積特性は quinine よりも優れていた。しかし metoclopramide の場合、その大半は上清画分に検出され、その約 70 % が遊離型であった。ミトコンドリア内における metoclopramide の特異な蓄積部位は認められなかった。ミトコンドリアの亜画分における塩基性薬物の分布はミトコンドリア外膜の指標酵素 (MAO) 活性と良く一致していた。しかし他の指標酵素活性の分布との間に関連性は認められなかった。これらの結果はミトコンドリア外膜が肺における塩基性薬物の主要結合部位であることを示している。

Table 12 Submitochondrial Distribution of Basic Drugs

Fraction No. @	% distribution			Binding (pmol/mg protein)		
	IMI*	QUI*	MET*	IMI*	QUI*	MET*
1	37.1±4.1	40.3±5.0	21.9±2.8	304±34	235±29	39±5
2	46.3±4.2	40.6±4.2	10.7±2.0	1041±95	651±68	40±7
3	16.5±2.0	18.9±1.1	67.3±9.5	275±35	223±13	46±7

\* IMI, imipramine; QUI, quinine; MET, metoclopramide.

@ Fraction 1, 12,000xg pellet; fraction 2, 105,000xg pellet; fraction 3, 105,000xg supernatant.

### 3-B 薬物脂溶性の影響

肺ミトコンドリア内薬物分布に及ぼす薬物脂溶性の影響について検討した。使



用した3種の塩基性薬物のうち最も脂溶性の高い imipramine の外膜画分への蓄積は他の薬物に比べて著明に高く, quinine, metoclopramide の順に低下した (Table 12)。各薬物の外膜画分への薬物蓄積比とその脂溶性との間には良好な相関性が認められた (Fig.32)。このことはミトコンドリア外膜画分への薬物蓄積性は薬物個々の脂溶性によって調節されていることを示唆している。

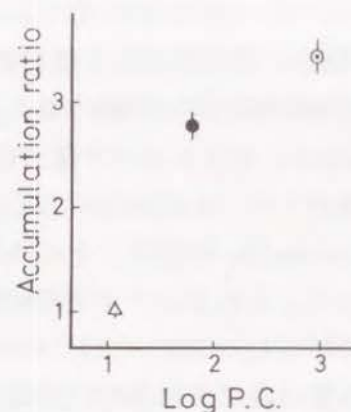


Fig.32 Effect of Lipid Solubility on the Distribution of Basic Drugs in Mitochondria Outer Membrane  
○, imipramine; ●, quinine; △, metoclopramide.

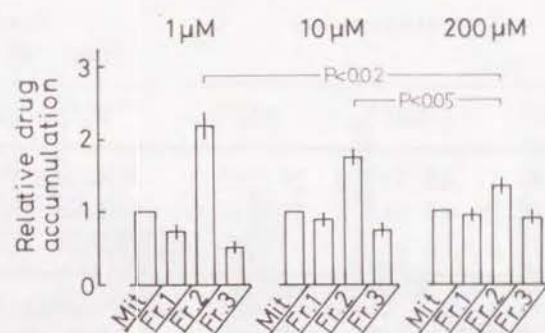


Fig.33 Effect of Initial Drug Concentration in Perfusate on Quinine Distribution in Mitochondria from the Perfused Rat Lung  
Mit, mitochondrial fraction; Fr.1, 12,000xg pellet;  
Fr.2, 105,000xg pellet; Fr.3, 105,000xg supernatant.

### 3-C 薬物濃度の影響

塩基性薬物のミトコンドリア外膜画分への蓄積に及ぼす薬物濃度の影響について検討した。Fig.33 に各種濃度における quinine のミトコンドリア内分布を示した。各濃度とも上清画分の薬物量は僅かであり, 大半がミトコンドリア成分と結合していた。各濃度とも外膜画分への薬物蓄積が最も高い値を示した。しかし, 薬物濃度の増加に伴い蓄積性は低下し, 濃度依存性のあることが判明した。

### 3-D 考 察

塩基性薬物の肺ミトコンドリア内の薬物蓄積部位を明確にするために, ジギトニン法を用いて薬物結合したミトコンドリアを更に細分画を行った結果, ミトコンドリア外膜画分に特異な薬物蓄積部位の存在を認めた。この外膜画分への薬物蓄積は薬物の脂溶性の上昇によって著しく増加し, また薬物結合に濃度依存性のあることが観察された。これらの結果は先に認めた還流肺の薬物蓄積特性ならびにミトコンドリアの薬物結合特性と良く対応していることから, ミトコンドリア外膜には塩基性薬物に対する特異な結合部位が存在し, 薬物肺蓄積の一翼を担っているものと推察される。



### 第Ⅲ章 塩基性薬物蓄積部位としての MAOの役割

第Ⅰ章及び第Ⅱ章において薬物の肺移行特性ならびに薬物蓄積部位としてのミトコンドリアの役割について検討した結果、(1) 肺には塩基性薬物に対して濃度依存性のある特異な蓄積機構が存在する。(2) その移行には塩基性薬物の脂溶性が大きく関与している。(3) 肺に蓄積された薬物の大半が代謝されず未変化体のまま存在している。(4) この薬物蓄積機構に能動輸送系の寄与は少なく、主に組織成分との結合により蓄積する。(5) 肺に取り込まれた薬物はミトコンドリア画分に選択的に分布する。(6) ミトコンドリアの *in vitro* 薬物結合特性が還流肺薬物移行特性と良く対応する。(7) 薬物の蓄積したミトコンドリアを細分画したとき、薬物は外膜画分により選択的に結合していることを明らかにした。しかしながら、ミトコンドリア外膜画分には種々の酵素が特異的に局在しており<sup>75)</sup>、それらのうちいずれと塩基性薬物の蓄積が関連しているのか、またそれが生体機能とどのような関係にあるのかは全く不明である。本章ではミトコンドリア外膜に特異的に局在する種々の酵素に及ぼす塩基性薬物の影響について検討すると共に、塩基性薬物結合部位へのモノアミン酸化酵素 (MAO) の関与を中心に詳細に検討した。

#### Ⅲ-1 ミトコンドリアにおける塩基性 薬物のMAO阻害

ミトコンドリア外膜にはMAOを始め種々の酵素が局在しており、様々な生体恒常性維持に関与していることが知られている。

MAOは 5-hydroxytryptamine, norepinephrine, epinephrine, dopamine, tyramine などの各種生体内アミンを代謝する酵素である。Gillis らはこの酵素による 5-hydroxytryptamine や phenylethylamine の代謝が塩基性薬物である imipramine によって抑制されることを報告している<sup>76,77)</sup>。このことは他の多くの研究者によっても認められていることから、阻害効果発現機構として imipramine がMAOの基質結合を阻害することに起因するものと推察される。この

ことは塩基性薬物の結合部位としてMAOが重要な役割を演じている可能性のあることを示唆している。この点を明確にするために、MAOを始めミトコンドリア外膜に特異的に局在している種々の酵素に及ぼす塩基性薬物の影響について検討した。

#### 1-A ミトコンドリア局在酵素に対する塩基性薬物の影響

ミトコンドリア局在酵素のうち外膜局在酵素としてMAO, ロテノン不応性 NADH 依存性チトクロムC還元酵素, キヌレニン脱水素酵素を、また内膜, 膜間スペース, マトリックスの局在酵素として各々チトクロム酸化酵素, 亜硫酸チトクロムC還元酵素, マレイン酸脱水素酵素を選び、各酵素の代謝活性に及ぼす imipramine および diphenhydramine の影響を測定した。Table 13 に酵素活性阻害率を示した。両塩基性薬物による阻害効果はMAOに対して特異的に認められた。しかし他の酵素に対して、阻害効果は殆ど観察されなかった。この結果は、塩基性薬物がMAOに対して特異的に作用し、酵素阻害効果を発現していることを示唆している。

Table 13 Effect of Basic Drug on Enzyme Activity of Lung Mitochondria

Enzyme	% activity Inhibitor**	
	Imipramine	Diphenhydramine
Monoamine oxidase*	4.9±1.2	9.0±1.7
Kynurenin hydroxylase	96.5±5.3	99.0±4.8
Rotenon-insensitive NADH- dependent cytochrome C reductase	95.2±3.7	97.8±5.0
Cytochrome oxidase	94.8±4.5	100.6±3.0
Sulfite cytochrome C reductase	101.2±5.0	99.5±4.2
Malate dehydrogenase	96.7±3.9	93.2±6.1

\* MAO substrate: phenylethylamine.

\*\* Concentration: 1mM.

#### 1-B 基質による阻害効果の変化

MAOは基質反応性及び阻害剤に対する感受性に基づいてタイプAとタイプBに分類されている<sup>78,79)</sup>。また基質についても 5-hydroxytryptamine はタイプA, phenylethylamine はタイプB, tyramine は両タイプの基質に分類されている。しかし基質濃度や溶媒の pH 変化に対するMAOの反応性が一様でなく、両



者の区別が判然としないことから、タイプ分類が余り意味をなさないことも報告されている<sup>80)</sup>。そこでミトコンドリアMAOによる各基質代謝特性について比較検討した (Table 14)。3基質の代謝パラメーターのうち  $V_{max}$  (最大代謝速度) は互いに近似した値を示したが、 $K_m$  (Michaelis-Menten 定数) は著しく異なり、phenylethylamine が最も低い値を示した。次に各タイプのMAOに対する imipramine および diphenhydramine の影響について検討した。各タイプの基質はいずれも両塩基性薬物によって阻害された。しかし脂溶性の高い酸性薬物である phenylbutazone による阻害効果は観察されなかった。塩基性薬物による代謝阻害は使用した3種の基質のうち phenylethylamine に対して最も効果的であった (Fig.34)。以上の成績を基にミトコンドリアMAOの基質として phenylethylamine を使用して以下の実験を行なった。

Table 14 Michaelis-Menten Kinetic Constants for Rat Lung Mitochondria MAO Activity

Substrate	$V_{max}$ (nmol/mg protein/min)	$K_m$ ( $\mu M$ )
Phenylethylamine	$3.6 \pm 0.3$	$6.1 \pm 0.6$
Tyramine	$3.7 \pm 0.3$	$27.4 \pm 4.3$
5-Hydroxytryptamine	$3.5 \pm 0.3$	$38.8 \pm 3.9$

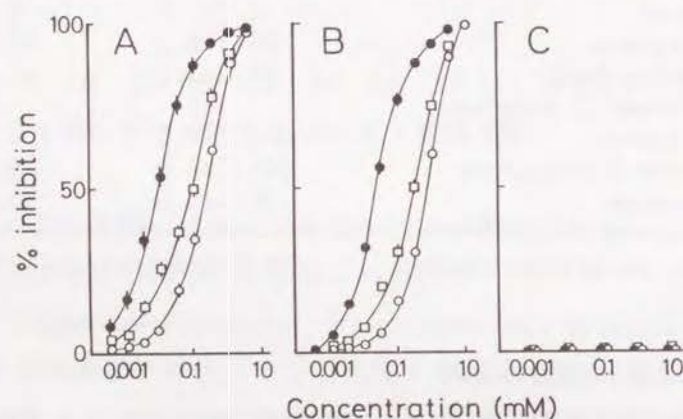


Fig.34 Effect of Imipramine(A), Diphenhydramine(B) or Phenylethylamine (C) on the Metabolism of MAO Substrates with Lung Mitochondria MAO substrate: ●, phenylethylamine; □, tyramine; ○, 5-hydroxytryptamine.

#### 1-C 塩基性薬物の影響

塩基性薬物のMAO不活化特性を明らかにするために phenylethylamine の脱アミノ化反応に及ぼす各種塩基性薬物の影響について検討した。Table 15 に各種薬物存在時の酵素活性を示した。Phenylethylamine の代謝は各塩基性薬物の添加によって抑制された。しかし各薬物の阻害能は著しく異なり、使用した塩基性薬物中 imipramine が最も阻害活性が強く、以下 diphenhydramine, allocloamide, quinine, metoclopramide, procainamide の順に低下した。しかし P.A.E.B. による阻害効果は認められなかった。この事実ことは塩基性薬物の全てが同等のMAO阻害効果を有しているのではないことを示唆している。

Table 15 MAO Inhibitory Activity and Partition Coefficients of Basic Drugs

Inhibitor	P.C.*	MAO activity(%)
Imipramine	980	$4.7 \pm 0.8$
Diphenhydramine	442	$6.9 \pm 1.1$
Allocloamide	582	$25.7 \pm 3.1$
Quinine	64.2	$67.9 \pm 3.2$
Metoclopramide	12.0	$74.9 \pm 1.3$
Procainamide	0.17	$94.9 \pm 1.4$
P.A.E.B.	0.01	$100.4 \pm 3.2$
Phenylbutazone	770	$98.7 \pm 2.9$

\* Partition coefficients ( $CHCl_3/H_2O$ , pH7.4)

#### 1-D 薬物濃度の影響

MAOによる phenylethylamine 脱アミノ化反応に及ぼす塩基性薬物濃度の影響について検討した。Fig.35 は横軸に阻害剤濃度の対数を、縦軸に阻害剤共存時の酵素活性百分率を示したものである。酵素活性は低濃度の阻害剤を共存させた時、ほとんど影響されなかった。しかし濃度の増加に伴って酵素活性は著しく低下し、高濃度では完全に阻害された。いずれの塩基性薬物も濃度の増加に伴ってMAO活性が低下した。各薬物の阻害効果には薬物間で差が認められたが、いずれも濃度に依存しており、ほぼ同様のシグモイド曲線を描いた。従って、MAOは各種塩基性薬物によって同様の阻害様式に基づいて抑制されるものと推察される。



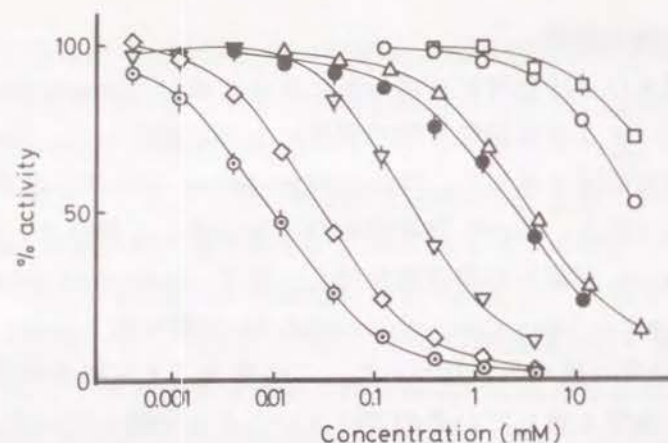


Fig. 35 Effect of Concentration of Basic Drug on Phenylethylamine Deamination by Lung Mitochondria  
 ◎, imipramine; ◇, diphenhydramine; △, metoclopramide;  
 ●, quinine; ▽, alloclamide; ○, procainamide; □, P.A.E.B..

#### 1-E 薬物脂溶性の影響

次に塩基性薬物のMAO阻害能力に影響を及ぼす要因を明らかにするために、阻害効果に及ぼす薬物脂溶性の影響について検討した。Fig. 36 は各塩基性薬物のMAO阻害濃度と脂溶性との関係について示したものである。両者の間に良好

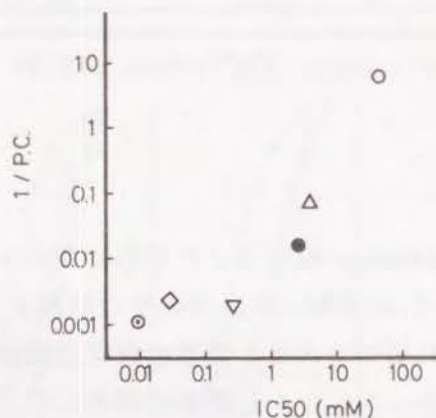


Fig. 36 Relationship between Inhibition Potency of Basic Drugs to Phenylethylamine Deamination and their Partition Coefficient ( $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ , pH7.4)  
 ◎, imipramine; ◇, diphenhydramine; △, metoclopramide;  
 ●, quinine; ▽, alloclamide; ○, procainamide.

な相関関係の在ることが判明した。このことは脂溶性の高い塩基性薬物ほど優れたMAO阻害活性を有していることを示している。

#### 1-F 阻害様式

塩基性薬物によるMAO活性の阻害様式について検討した。Fig. 37 A は diphenhydramine 共存時の phenylethylamine の脱アミノ化反応について Lineweaver-Burk plots したものである。代謝速度は diphenhydramine の濃度増加に伴って低下した。Diphenhydramine 共存時の回帰曲線は各濃度において直線性を示し、いずれも縦軸の同一点を通過した。このことはMAO活性が diphenhydramine によって競合的に阻害されることを示している。また metoclopramide, procainamide の共存により同様の現象が認められたが (Fig. 37 B, C), 脂溶性の高い酸性薬物である phenylbutazone を高濃度共存させても阻害効果は観察されなかった (Fig. 37 D)。そこでこれら塩基性薬物の阻害定数を求め比較検討したのが Table 16 で、diphenhydramine の阻害定数が他の薬物に比べて最も小さ

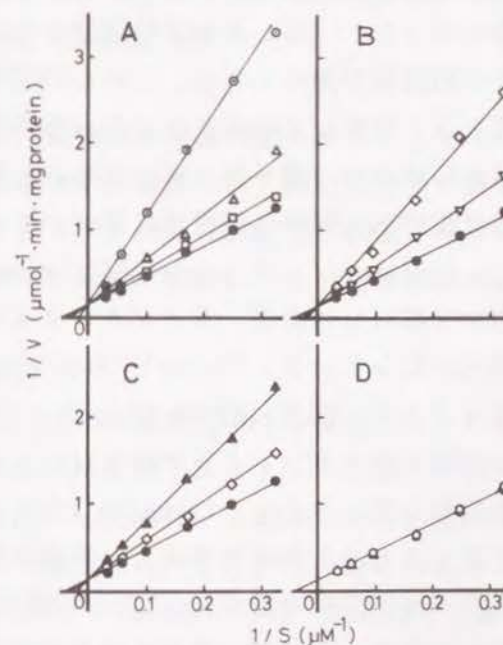


Fig. 37 Lineweaver-Burk Plots for the Inhibition of Phenylethylamine Deamination by Diphenhydramine (A), Metoclopramide (B), Procainamide (C) or Phenylbutazone (D)  
 Drug concentration: ●, 0μM; □, 4μM; △, 12μM; ○, 40μM;  
 ▽, 1mM; ◇, 4mM; ▲, 12mM; ○, 30mM.



Table 16 Inhibition Constant of Basic Drug for MAO

Inhibitor	Ki (mM)
Imipramine	0.013±0.002
Diphenhydramine	0.021±0.004
Metoclopramide	2.3 ±0.4
Procainamide	22.8 ±3.0

な値を示した。これらの値は Fig.35 から求めた 50 % 阻害濃度とほぼ近似していた。

### 1-G 考 察

塩基性薬物の肺組織結合部位としてのミトコンドリアMAOの寄与を明確にするために、塩基性薬物の肺ミトコンドリアMAO活性阻害効果について検討した結果、以下のことを明らかにした。(1) MAO活性は塩基性薬物の共存により阻害された。(2) その阻害効果に濃度依存性が認められた。(3) 塩基性薬物による阻害様式が競合的であった。(4) 各塩基性薬物のMAO活性阻害効果とその脂溶性との間に良好な相関性が認められた。これらの成績は第I章で認めた摘出還流肺薬物移行特性とよく対応していることから、塩基性薬物の肺蓄積部位としてミトコンドリアMAOがその一翼を担っているものと推察される。

ミトコンドリアMAOは阻害剤に対する感受性に基づいてタイプAとタイプBに分類されている<sup>80,81)</sup>。Cawthon<sup>82)</sup>らは proteolytic digestion 法及び peptide mapping 法を用いて検討した結果、タイプAとタイプBのMAOが異なった分子であることを明らかにしている。Tipton<sup>83)</sup>らはラット肺ミトコンドリアMAOの約 50 % がタイプAで、残り (約 50 %) がタイプBであると報告している。しかし、今回の実験で肺ミトコンドリアMAOによる各タイプのMAO基質の  $V_{max}$  値が互いに近似していること、tyramine (両タイプ基質) 代謝が阻害剤濃度に対してシングルシグモイド曲線を描くことを認めた (一般に、両タイプ基質の場合デュアルシグモイド曲線を描く)。これらの成績は単一のMAOによって十分説明できるものであり、タイプの異なるMAOの存在を指示する成績は得られなかった。一方、phenylethylamine の脂溶性が tyramine, 5-hydroxytryptamine のそれに比べて高いことから、ミトコンドリアMAOに対する基質の親和性が脂溶性によって調節されている可能性のあることが推察される。従っ

て、各基質のMAOタイプと酵素に対する親和性との関係について、今後詳細に検討する必要がある。

本節においてミトコンドリアMAO活性に及ぼす各種塩基性薬物の影響について検討し、各塩基性薬物が競合的にMAO活性を阻害することを認めた。またこれら塩基性薬物の阻害効果はその脂溶性と良く相関していることを認めた。近年、様々の分野においてMAO活性に及ぼす化合物の影響について検討されている。しかし何れの研究者も化合物のMAO活性阻害能とその物理化学的特性との関係について詳細に検討していない。今回の研究より、塩基性薬物のMAO活性阻害能とその脂溶性との関係は明白であり (Fig.36)、少なくとも、化合物のMAO活性阻害能が塩基性基の有無とその脂溶性に基づいて予測可能なことを示唆している。また種々の薬物の薬効・毒性がMAOによる各種生体内アミンの代謝を抑制することによって発現している可能性のあることが推察される。

## III-2 灌流肺における塩基性薬物のMAO阻害

III-1において塩基性薬物の肺組織内結合部位としてミトコンドリアMAOが関与している可能性を示した。本節では、細胞成分レベルで認めた塩基性薬物結合部位としてのミトコンドリアMAOの役割が臓器レベルでも認められるか否か、摘出肺灌流実験法を用いて詳細に検討し、その結合機構の解明を試みた。

### 2-A 灌流条件の検討

摘出灌流肺のMAO活性が実験期間中十分保持されているか否か、また既知の特異的MAO inhibitor (MAOI) によって代謝が阻害されるか否か検討した。MAO基質である phenylethylamine を灌流した時、灌流開始後代謝活性は徐々に上昇し、約 5分後に平衡状態に達した。この時の代謝率は約 70 % であり、実験期間中はほぼ一定していた (Fig.38)。一方、MAOIである pargyline を共存させた時、代謝活性は約 10 % 程度に低下し、基質の大半が未変化体のまま灌流液中に流出してきた。MAOIによる代謝阻害は灌流途中に inhibitor を共存させた場合にも初期共存時と同等の阻害効果を示した。これらの成績は他の研究者の成績<sup>84,85)</sup>とよく対応していることから、本実験系においてMAO活性が十



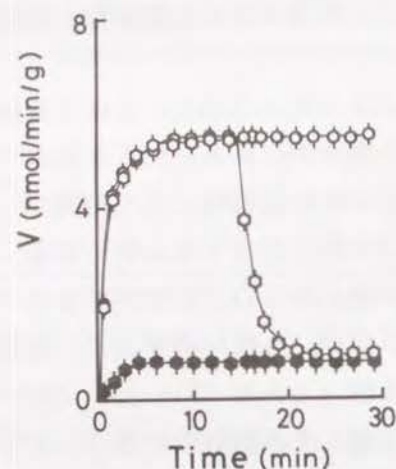


Fig.38 Effect of Pargyline on the Metabolism of Phenylethylamine in Isolated Perfused Rat Lung  
Lungs were perfused with PEA only(○), with PEA and pargyline (●) or with PEA for 15min and then with PEA and pargyline(○).

分保持されており、また phenylethylamine は主に MAO により代謝されているものと判断される。以下、同一実験条件を用いて検討した。

## 2-B 塩基性薬物の影響

塩基性薬物による灌流肺 MAO の不活化特性を明確にするために、phenylethylamine 代謝に及ぼす各種塩基性薬物の影響について検討した。各種塩基性薬物の共存によって phenylethylamine の代謝抑制が認められた。また各塩基性薬物の阻害効果に差の有ることを認めた (Fig.39)。このことは塩基性薬物の全てが同等の MAO 阻害効果を有しているのではないことを示唆している。さて臓

Table 17 Effect of Basic Drugs on Initial Uptake of PEA by the Perfused Lung

Basic drug	Uptake (nmol/15sec/g tissue)
None	1.89±0.06
Imipramine	1.88±0.07
Diphenhydramine	1.89±0.04
Quinine	1.90±0.07
Metoclopramide	1.88±0.08
Procainamide	1.90±0.06

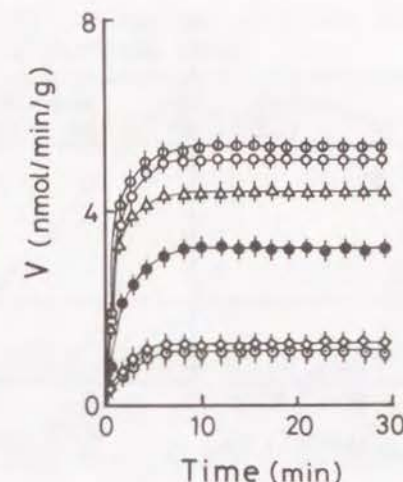


Fig.39 Effect of Basic Drugs on the Metabolism of PAE in Isolated Perfused Rat Lung  
Basic drug: ○, imipramine; ◇, diphenhydramine; ●, quinine; △, metoclopramide; ○, procainamide; ⊕, control.

器レベルにおける代謝抑制は、一般に基質の組織移行過程の阻害と酵素部位での基質代謝阻害とに大別される。しかし、MAO 基質の灌流肺初期取り込みに塩基性薬物による影響が観られないこと (Table 17), III-1 に示したようにミトコンドリア画分による MAO 基質代謝が塩基性薬物により抑制されることから、臓器レベルで認めた塩基性薬物による代謝抑制は薬物の酵素への直接作用によるものと推察する。

## 2-C 阻害様式

塩基性薬物による灌流肺 MAO 活性の阻害様式について検討した。Fig.40 に diphenhydramine 共存時及び非共存時の灌流肺による phenylethylamine の代謝成績を示した。代謝速度は基質濃度の上昇に伴って一定値に漸近し、飽和現象のあることが観察された (Fig.40 A)。Eadie-Hofstee plot した時 diphenhydramine 共存時及び非共存時の回帰曲線は各濃度において直線性を示し、いずれも縦軸の同一点で交差した (Fig.40 B)。Imipramine, quinine, metoclopramide についても検討した結果、同様の成績が得られた。各薬物の阻害定数を Table 18 に示した。従って、塩基性薬物の MAO 阻害様式は競合阻害であると判断される。この結果は、塩基性薬物が MAO 基質結合部位に結合して阻害効果を発現していることを示唆している。



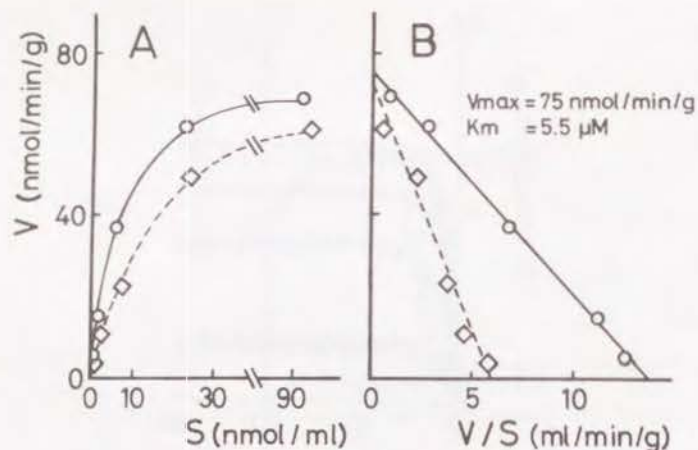


Fig.40 Effect of Diphenhydramine on MAO Activity in Isolated Perfused Rat Lung  
Lungs were perfused with PEA only(○) or with PEA and diphenhydramine(◇).

#### 2-D 薬物脂溶性の影響

灌流肺MAOに対する塩基性薬物の結合性を制御している要因について検討した。各種塩基性薬物のMAO結合性と脂溶性との関係を Fig.41 に示した。なお、

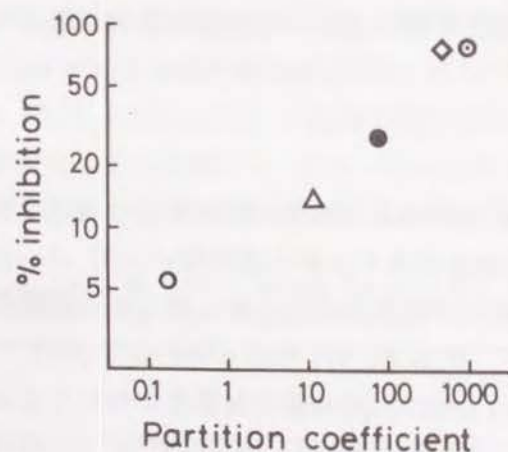


Fig.41 Relationship between Inhibition Potency of Basic Drugs(0.5mM) to MAO Activity and their Partition Coefficient( $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ , pH7.4)  
○, imipramine; ◇, diphenhydramine; △, metoclopramide;  
●, quinine; ○, procainamide.  
 $\log(\% \text{ inhibition}) = 0.311 \log(\text{P.C.}) + 0.947$   $r = 0.981$

Table 18 Inhibition Constant of Basic Drug for MAO in the Perfused Lung

Inhibitor	IC <sub>50</sub> (mM)	K <sub>i</sub> (mM)
Diphenhydramine	0.08	0.021±0.004
Imipramine	0.11	0.013±0.002
Metoclopramide	1.9	2.3 ±0.4
Procainamide	4.9	22.8 ±3.0

薬物のMAO結合性は酵素活性阻害率により、また脂溶性はクロロホルム/水間の薬物分配係数により示した。Fig.41 から明らかなように、両者の間に良好な相関性が認められた ( $r=0.92$ )。従って脂溶性の高い薬物ほどMAOに対する結合性が高いことが明らかとなった。

#### 2-E 薬物濃度の影響

灌流肺MAOの塩基性薬物結合に及ぼす薬物濃度の影響について検討した。

Fig.42 に各薬物共存時のMAO活性と共存薬物濃度との関係を示した。いずれの塩基性薬物もほぼ同様のパターンを示し、薬物濃度の上昇に伴ってMAO活性が低下した。すなわち、薬物のMAOへの結合が濃度に依存していると言える。一方、脂溶性の高い酸性薬物である phenylbutazone を共存させた場合、酵素阻

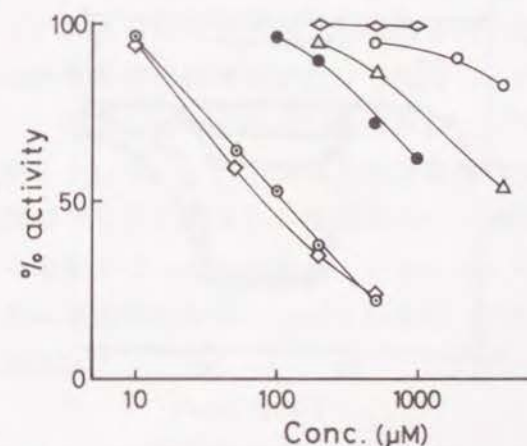


Fig.42 Effect of Drug Concentration on MAO Activity in the Isolated Perfused Rat Lung  
○, imipramine; ◇, diphenhydramine; △, metoclopramide;  
●, quinine; ○, procainamide; ◇: phenylbutazone.



害効果は観察されなかった。これらの事実は、薬物のMAO結合性を左右する要因として薬物脂溶性及び塩基性基の有無が重要なことを示唆している。なお、各塩基性薬物のMAO活性 50 % 阻害濃度を Fig.42 より求め、Ⅲ-2-Cで求めた阻害定数と比較検討した結果、Table 18 から明らかなように、両者の値は非常に近似していた。

## 2-F 阻害効果の可逆性

灌流肺MAOに対する塩基性薬物結合の可逆性について検討した。すなわち、まず灌流肺にMAO基質のみを灌流し、平衡状態に達した時点で一定期間塩基性薬物を共存させて灌流した。その後再び基質のみを含む灌流液に変更して代謝実験を継続した。この時の灌流液中の基質代謝率の経時変化を Fig.43 に示した。塩基性薬物の共存により認められたMAO活性の抑制は灌流液から共存薬物を除去することにより徐々に回復していき metoclopramide 及び quinine では約 5 分後に、また diphenhydramine では約 15 分後に元のレベルに回復した。従って、脂溶性の高い塩基性薬物、すなわちMAO親和性の高い薬物では回復に多少時間を要するものの、MAOに対する塩基性薬物の結合は可逆的であると考えられる。

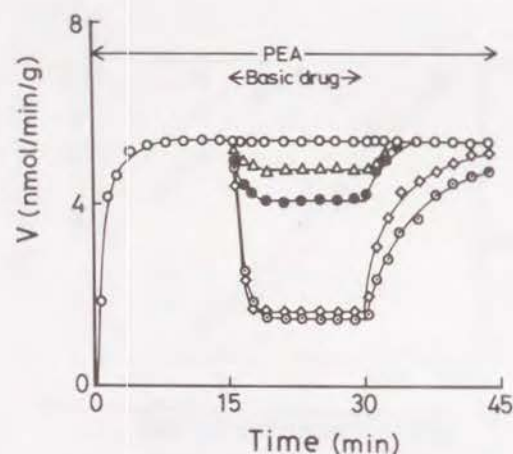


Fig.43 Reversibility of Inhibitory Potency of Basic Drug to MAO in the Isolated Perfused Rat Lung  
 ⊙, imipramine; ◇, diphenhydramine; △, metoclopramide;  
 ●, quinine; ○, control.

## 2-G 考 察

塩基性薬物の肺蓄積部位としてのMAOの関与を明らかにするため、灌流肺MAOに及ぼす各種塩基性薬物の影響について検討した結果、1) 塩基性薬物は特異的にMAO基質結合部位に結合してMAO活性を阻害する。2) 灌流肺MAOに対する塩基性薬物の結合に薬物脂溶性が関与している。3) MAOに対する塩基性薬物の結合に濃度依存性がある。4) 塩基性薬物による阻害様式が競合的である。5) 灌流肺MAOに対する塩基性薬物の結合が可逆的である事を認めた。これらの成績は、Ⅲ-1で認めた塩基性薬物によるミトコンドリア画分のMAO阻害実験の成績と一致しており、ミトコンドリアMAOが摘出灌流肺においても塩基性薬物結合部位として非常に重要な役割を担っていることを示唆している。

## Ⅲ-3 塩基性薬物の肺蓄積部位におけるMAOの寄与

モノアミン酸化酵素(MAO)は殆どの脊椎、無脊椎動物に含まれる酵素である。細胞内のミトコンドリア外膜に強く結合して存在し、神経系の活動に重要な役割を担っている<sup>86,87)</sup>。すなわち、脳内MAO活性は鬱病などの精神疾患の発症と、また末梢では高血圧症などの発症とも密接に関連している可能性が示唆されている。従って、MAOは生理学的にも薬理的にも大変興味をもたれている。

このMAOが塩基性薬物の蓄積部位として機能している可能性の在ることをⅢ-1, 2で示した。現在、様々な治療に使用されている薬物のうちかなりの部分が塩基性薬物に属している。これら薬物の薬効毒性発現機構を解明するためにも塩基性薬物蓄積部位としてのMAOの役割をより一層明確にすることは非常に重要である。そこで本節ではこの点を明確にするために塩基性薬物の肺ミトコンドリア結合性ならびに還流肺蓄積性に及ぼすMAO inhibitor (MAOI)の影響について詳細に検討した。

### 3-A ミトコンドリアの薬物結合に及ぼすMAOIの影響

肺ミトコンドリアの塩基性薬物結合に及ぼすMAOIの影響について検討した。各MAOIで前処理したミトコンドリアの塩基性薬物の結合性を Table 19 に示した。いずれのMAOIで処理したときにも薬物結合性は著明に低下した。Imi-



pramine のミトコンドリア結合に及ぼす阻害効果は pargyline が最も強く、次いで iproniazide, acetoaminonitrile, semicarbazide の順に低下した。Quinine, metoclopramide のミトコンドリア結合にも同様の阻害効果が認められた。各 MAOI による MAO 活性阻害順位もほぼ同様の成績を示した。しかし各 MAOI の塩基性薬物結合阻害効果は imipramine に対して最も強く、次いで quinine, metoclopramide の順に低下した。すなわち、脂溶性の高い薬物ほど MAOI による阻害効果をより強く受けることを認めた。

各 MAOI による薬物結合阻害能の相違を明らかにするために、各 MAOI のミトコンドリア薬物結合阻害効果と MAO 活性阻害効果との関係について検討した。Fig. 44 に示す様にいずれの塩基性薬物にも両者間に良好な相関性を認めた。pargyline 処理によってミトコンドリアの MAO 活性をほぼ完全に抑制した場合の imipramine のミトコンドリア結合阻害率は約 55 % であり、quinine のそれは約 45 % であった。

次に MAOI によるミトコンドリア塩基性薬物結合の阻害様式を明らかにするために、各 MAOI で処理したミトコンドリアの薬物結合性について Scatchard plots により解析した。Pargyline 処理したミトコンドリアの薬物結合性は、高濃度処理したとき塩基性薬物高親和性結合部位への imipramine 及び quinine 結合をほぼ完全に阻害した (Fig. 45)。しかし低濃度処理した時には部分的な阻害が観察されるのみであった。これに対して、低親和性結合部位への薬物結合は MAOI 濃度に拘らず不変であった。また semicarbazide 高濃度処理した時、pargyline 低濃度処理時と近似したパターンを示した。しかしその抑制効果は低値であった。いずれの MAOI を用いたときにも塩基性薬物高親和性結合部位の

Table 19 Effect of MAOI on the Accumulation of Basic Drugs in the Lung Mitochondrial Pellet

MAOI	P/M(ml/mg protein)			% of control		
	IMI*	QUI*	MET*	IMI*	QUI*	MET*
Control	24.6±0.8	4.7±0.3	0.32±0.04			
Aminoacetonitrile	19.3±1.2	3.8±0.2	0.30±0.04	78±3	82±3	95±9
Semicarbazide	21.4±0.7	4.1±0.3	0.30±0.04	87±1	88±4	97±10
Iproniazid	16.8±0.4	4.1±0.2	0.29±0.05	68±1	88±3	92±13
Pargyline	11.6±0.6	3.1±0.2	0.24±0.05	47±3	66±5	76±9

\* IMI, imipramine; QUI, quinine; MET, metoclopramide.

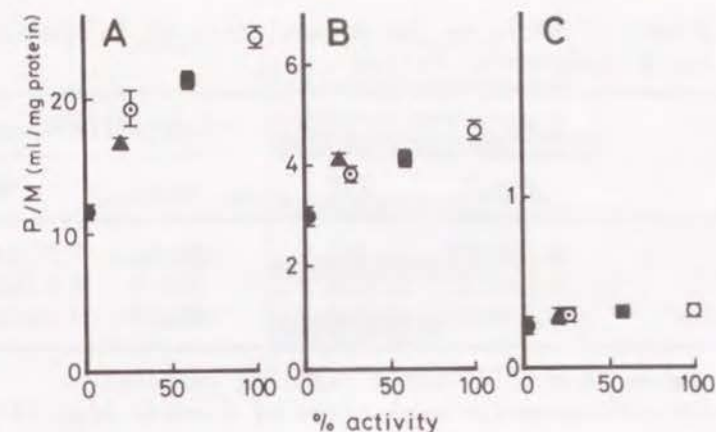


Fig. 44 Effect of MAOI on the Binding of Imipramine(A), Quinine(B), or Metoclopramide(C) to Lung Mitochondria. Mitochondria was treated with 1mM of semicarbazide(■), iproniazid(▲), aminoacetonitrile(⊙), pargyline(●), or none(○) for 15min.

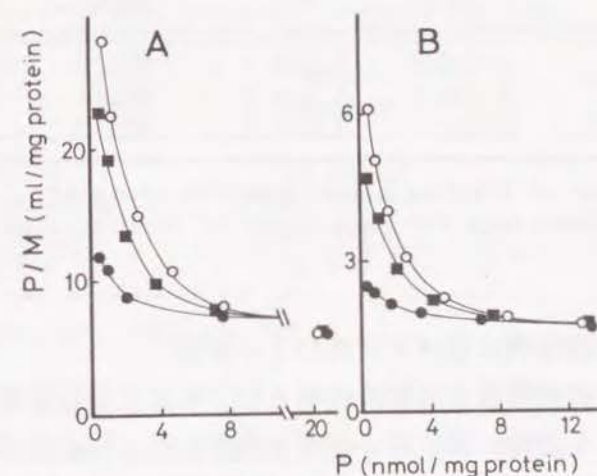


Fig. 45 Scatchard Plot of Specific Binding of Imipramine(A) or Quinine(B) to Rat Lung Mitochondria Treated with Semicarbazide(■), Iproniazid(▲), Pargyline(●), or None(○)

減少が認められた。しかし、親和性 (結合定数) には変化は認められなかったことから、非競合阻害によって塩基性薬物の結合を阻害するものと判断された (Table 20, 21)。これらの結果は、ミトコンドリア MAO が塩基性薬物の高親和性結合部位として機能していることを示している。



Table 20 Effect of MAOIs on the Accumulation of Imipramine in the Mitochondrial Pellet

Inhibitor	High-affinity site		Low-affinity site	
	B <sub>max</sub> *	K <sub>a</sub> #	B <sub>max</sub> *	K <sub>a</sub> #
None	4.0±0.69	5.3±1.2	94±10	0.072±0.0008
Pargyline	1.2±0.3	5.0±0.8	88±9	0.076±0.011
Semcarbazine	3.5±0.5	5.2±0.7	95±8	0.065±0.010

\* Maximum number of binding sites (nmol/mg protein).

# Association constants for each class of binding site (1/μM).

Table 21 Effect of MAOIs on the Accumulation of Quinine in the Mitochondrial Pellet

Inhibitor	High-affinity site		Low-affinity site	
	B <sub>max</sub> *	K <sub>a</sub> #	B <sub>max</sub> *	K <sub>a</sub> #
None	3.5±0.5	1.5±0.3	81±9	0.023±0.004
Pargyline	1.1±0.3	1.3±0.3	95±11	0.020±0.003
Semcarbazine	2.8±0.5	1.6±0.4	93±10	0.019±0.004

\* Maximum number of binding sites (nmol/mg protein).

# Association constants for each class of binding site (1/μM).

### 3-B 灌流肺の薬物蓄積に及ぼすMAOIの影響

肺ミトコンドリアの薬物結合で認めたMAOIによる塩基性薬物結合阻害効果が還流肺薬物蓄積にも同様に認め得るか否かを検討した。Fig.46 は各MAOIにより15分間前処理した時のimipramineの肺移行性について示したものである。MAOI処理によりimipramineの肺移行率ならびにL/Pf比は低下した。抑制効果はpargylineが最も顕著であり、次いでiproniazid, semcarbazineの順であった。この阻害効果は塩基性薬物の低濃度時に特に顕著であり、高濃度時には認められなかった。

さて還流実験の場合、還流液中薬物の蛋白結合率は個体間にかなりばらつきがみられる。そこでMAOIの影響をより一層明確にするために灌流液に3.5% BSA Krebs-Ringer sol. (pH7.4) を使用し、quinine肺移行性について検討し

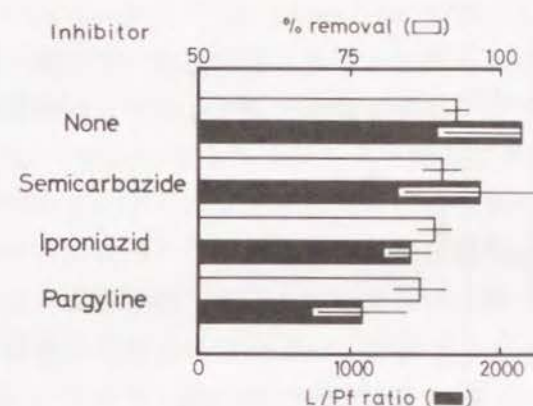


Fig.46 Effect of MAOI on the Accumulation of Imipramine in the Perfused Lung  
Lungs were treated with 2mM of MAOI for 15min.

Table 22 Effect of MAOI on the Accumulation of Quinine in the Isolated Perfused Rat Lung

MAOI	Uptake (nmol/g)	% of control
Control	64.0±5.9	100
Semcarbazine	59.5±3.0	93.0±10.5
Iproniazid	43.7±1.5	68.3±9.8
Pargyline	32.6±5.5	50.9±19.2

Quinine, 1μM; MAOI, 0.5mM.

た。Table 22 に成績を示した。コントロール群に比べてMAOI処理群では明確なquinine肺蓄積の抑制が認められた。

MAOI間における塩基性薬物の肺蓄積抑制効果の相違を明らかにするため、各MAOIによる塩基性薬物肺蓄積の抑制効果と灌流肺MAO活性阻害効果の関係について検討した。Fig.47 に両者の関係を示した。図から明らかなように、両者の間に良好な相関性が認められた。またquinineの肺蓄積において約50%がMAOの寄与によるものと判断された。この値はミトコンドリア薬物結合で認めた成績と非常に近似していた。このことは、肺ミトコンドリア薬物結合で認めたMAOIの阻害効果が灌流肺薬物蓄積においても同程度発現していることを示すと共に、MAOが塩基性薬物の高親和性結合部位として機能していることを



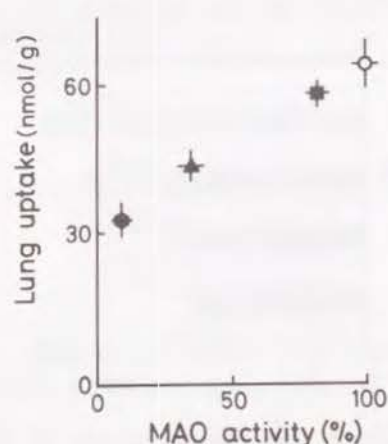


Fig.47 Effect of MAOI on the Accumulation of Quinine and MAO Activity in the Perfused Lung  
Lungs were treated with 0.5mM of MAOI for 15min.  
MAOI: ○, none; ■, semicarbazide; ▲, iproniazid; ●, pargyline.

示している。また更に、ミトコンドリア薬物結合で認めたMAOIによる阻害効果が単に処理操作に伴う二次変性によるものではないことを示唆している。

### 3-C 考 察

肺ミトコンドリアMAOの塩基性薬物蓄積部位としての関与を明確にするために、薬物蓄積に及ぼすMAOIの影響について検討した。肺ミトコンドリア画分をMAOIで処理したとき、塩基性薬物のミトコンドリア結合性は著明に低下した。各MAOIによる薬物結合抑制効果とMAO活性阻害効果との間には良好な相関性が認められた。このMAOIによる薬物結合抑制効果はII-2で認めた高親和性結合部位に対して特異的であり、その阻害様式は非競合的であった。また肺還流実験でもミトコンドリア薬物結合実験と同様、MAOI処理によって薬物の肺蓄積が低下すること、各MAOIによる還流肺薬物蓄積低下度とミトコンドリア結合低下度との間に良好な相関性の在ることを認めた。このことはMAOがミトコンドリアレベルにおいてのみ塩基性薬物高親和性結合部位として機能しているのではなく、肺組織レベルにおいても薬物蓄積部位として重要な役割を演じていることを示している。

Hellerman ら<sup>88)</sup>は pargyline が腎ミトコンドリアに不可逆的に結合すること

を報告している。Parkinson ら<sup>89)</sup>は pargyline がラット肝ミトコンドリアに結合し、MAO基質の脱アミノ化を阻害することを明らかにしている。本節で各種MAOIが塩基性薬物のミトコンドリア高親和性結合部位への結合を選択的に阻害することを示した。Intact なミトコンドリアMAOの分離精製方法が未だ確立されていないことから、ミトコンドリアMAOの塩基性薬物結合能を決定することは不可能であり、またミトコンドリアMAOが塩基性薬物の高親和性結合部位を占めているか否か直接証明することは出来ない。肺ミトコンドリアのMAO活性の  $V_{max}$  及び高親和性結合部位の  $B_{max}$  が各々 3.6 nmol/mg protein/min, 4.5 nmol/mg protein であり、摘出肺のそれが各々 1 nmol/mg protein/min, 2 nmol/mg protein であった。 $V_{max}$  と  $B_{max}$  の間には一部次元の相違が認められることから、両者を直接比較することは出来ないが、各実験系における両者の値が互いに近似していること、またミトコンドリア標識酵素活性が肺組織に比べてミトコンドリア画分で約 5 倍濃縮されており、両実験系の  $V_{max}$  及び  $B_{max}$  がよくこの成績と対応していることを認めた。従って、ミトコンドリアMAOが塩基性薬物の高親和性結合部位と大きくかけ離れていないように思われる。薬効は吸収・分布・代謝・排泄などの pharmacokinetic process と 特定の受容体への結合による pharmacodynamic process によって発現されるが、各過程における薬物挙動は個々の薬物において著しく異なっている。従って、細胞成分レベル及び還流臓器レベルで得られた成績をそのまま生体レベルに当てはめることは出来ない。三環性抗鬱薬の imipramine の作用機構は中枢神経系における生体内アミンの代謝を阻害することによって薬効を発現すると考えられており、imipramine の最小薬効発現濃度 (MEC) 約 0.3 $\mu$ M で、肺でもMAO活性が 10 % 程度低下することは興味深い (Fig.35)。今回使用した各塩基性薬物のMECが 0.1-20 $\mu$ M の範囲に分布しているが、各薬物ともMECではほとんどMAO活性に影響することはないものの、連続投与したとき、様々な精神神経性副作用を発現することが報告されている。従って、塩基性薬物の薬効或いは副作用の一部がミトコンドリアMAOによる生体内アミンの代謝を阻害することによって発現する可能性も十分考慮すべきであろう。



## 結 語

以上、著者は3章にわたり薬物肺移行性について詳細に検討し、以下の結論を得た。

### I. 還流肺における薬物移行性

ラット摘出肺還流実験法を用いて物性の異なる各種薬物の肺移行性を詳細に解析した。中性・酸性薬物では、還流液から肺への薬物移行率が低く、還流液中遊離薬物濃度に対する肺組織中濃度の比が広い濃度範囲で一前後となり、単純拡散による肺移行が推察された。これに対して塩基性薬物では、還流液から肺への薬物移行率が高く、濃度依存性があり、薬物の肺移行率と脂溶性との間に良好な相関性が認められた。この薬物蓄積性は、各種代謝阻害剤の前処理によって変化せず、還流液pHの変化に対しても僅かな変動を示すのみであった。還流後、還流液及び肺組織中に塩基性薬物の代謝物は検出されず、還流液から消失した薬物の大半が肺組織より回収された。各塩基性薬物の肺蓄積は他の塩基性薬物の共存によって競合的に抑制され、その抑制効果と脂溶性との間に良好な相関性が認められた。更に、肺に取り込まれた塩基性薬物は、第二の塩基性薬物を還流液に添加することによって容易に置換された。この第二の塩基性薬物による置換率と先の共存時の取り込み抑制率とがほぼ等しい値を示した。これらの結果は、肺に塩基性薬物に対する特異的かつ可逆的な結合部位が存在し、その親和性に薬物の脂溶性が大きく関与していることを示している。

### II. 肺細胞内における薬物局在性

肺に存在する塩基性薬物の特異な結合部位をよりミクロな観点から精査するために細胞成分分画を行ない、subcellular level における薬物分布特性について検討した。各細胞成分分画への薬物分布は、ミトコンドリア局在酵素の分布と良く対応した成績を示し、ミトコンドリア分画への親和性が他の分画に比して最も高いことを認めた。またミトコンドリアに対する塩基性薬物の結合は、脂溶性の高い薬物ほど強く、濃度依存性があり、他の塩基性薬物の共存によって競合的に阻害された。その阻害効果は共存薬物濃度に依存しており、各共存薬物の阻害効果と脂溶性との間に良好な相関性が認められた。また、各塩基性薬物のミトコン

ドリア結合性ならびに還流肺蓄積性を各々 Scatchard plots したとき、両者に結合性の異なる2種の結合部位の存在が認められ、両実験系の結合パラメーターは薬物間で良い相関を示した。これらの成績は、塩基性薬物の肺蓄積部位として、ミトコンドリアが重要な役割を担っていることを示している。そこで更にミトコンドリア内の薬物結合部位を精査するために、薬物結合したミトコンドリアの細分画を行なった。その結果、ミトコンドリア外膜画分に塩基性薬物に対する高親和性結合部位の存在することを認めた。

### III. 塩基性薬物蓄積部位としてのMAOの役割

ミトコンドリア外膜における塩基性薬物の蓄積が明らかとなったのでその詳細な機構を解明するために、ミトコンドリア外膜局在酵素に及ぼす薬物の影響について検討した。その結果、モノアミン酸化酵素(MAO)のみが塩基性薬物によって阻害された。そこで塩基性薬物の肺蓄積部位としてのMAOの役割について検討した。ミトコンドリアのMAO活性は塩基性薬物の共存によって競合的に阻害され、そのMAO活性阻害効果と脂溶性との間に相関性のあることが認められた。また摘出灌流肺実験系においても同様の結果が認められた。これらの成績は先の還流肺薬物移行実験ならびにミトコンドリアの薬物結合実験で得た成績と良く対応しており、塩基性薬物の肺蓄積におけるMAOの重要性が示唆された。この点を更に明確にするために、塩基性薬物のミトコンドリア結合性に及ぼす各種MAO阻害剤(MAOI)の影響について検討した。MAOI処理によってミトコンドリアの薬物結合性は低下し、各MAOIによる薬物蓄積の抑制効果とMAO活性阻害効果との間に良好な相関性が認められた。このMAOIによる薬物結合阻害効果はミトコンドリアの塩基性薬物高親和性結合部位に対して特異的に認められ、その阻害は非競合的であった。灌流肺実験においてもミトコンドリア実験と同様、MAOI処理によって薬物蓄積の低下が観察され、各MAOIによる灌流肺薬物蓄積の低下度とミトコンドリア薬物結合の低下度との間に良好な相関性が認められた。これらの結果は、MAOがミトコンドリアレベルにおいて塩基性薬物高親和性結合部位として機能しているだけでなく、肺の臓器レベルにおいても薬物蓄積部位として重要な役割を担っていることを示唆している。

以上、薬物肺移行性の制御要因について精細に検討した結果、薬物の脂溶性ならびに塩基性基の有無が肺蓄積に重要な影響を及ぼすこと、またミトコンドリア



MAOが塩基性薬物の高親和性結合部位として機能していることを初めて明らかにした。これらの知見は、呼吸器疾患治療薬などの体内分布特性や薬効毒性の解析予測を行なう上で、あるいはエアロゾル等による drug delivery system を考慮して行く上で、有益な示唆を与えるものと判断される。

## 謝 辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭達を賜りました京都大学 堀 了平 教授に哀心より深甚なる謝意を表します。

また、種々の有益なる御助言と御指導を頂きました神戸大学 奥村勝彦 教授に深謝致します。

更に有益なる御助言を頂いた京都大学医学部附属病院薬剤部研究室一同に深く感謝致します。



## 実験の部

### 第 I 章 実験の部

#### I - 1 摘出肺灌流法の検討

##### 1) 試薬

各薬品は市販品特級を使用した。各試薬とも特に精製は行なわなかった。

##### 2) 動物

体重 170-220g の Wistar 系雄性ラットを使用した。各ラット共購入後約 1 週間気温  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$  の部屋で自由に飲食させて飼育した後使用した。

##### 3) 摘出肺還流法

ラットを pentobarbital ( $37.5\text{mg/kg}$ , ip) で麻酔し仰位に固定した後股静脈より heparin ( $1000\text{IU/kg}$ ) を投与した。咽頭部を切開して結紮糸を掛けた後腹部正中線に沿って切開し、下行大動脈より脱血した。脱血終了直前の吸気時に気管を結紮し、腹部側より挟みを入れ、肺に損傷を与えないように注意深く胸部を切開した。肺動脈に結紮糸を掛けた後、血液を充填した肺動脈カニューレを右心室より肺動脈に挿入し結紮糸で固定した。大部分の心臓を除去した後、肺を摘出して生理食塩液中で軽く洗浄し、脱脂綿上で気管カニューレ (外径  $3\text{mm}$ 、内径  $2\text{mm}$ 、長さ  $30\text{mm}$ ) を挿入して結紮糸で固定した。秤量後灌流装置内に装着した。Fig. 1 は還流装置を略図化したものである。中央の 2 重ビーカーの間に  $37^{\circ}\text{C}$  の水を還流させて恒温を維持した。ビーカー内の気密性を保つために栓はシリコンゴムを使用した。なお、このゴム栓の中央に気管カニューレ用の穴を開け、その周囲に灌流用、灌流液採取用、マノメーター接続用、陰圧源接続用、湿潤ガス注入用の細い金属管を配置した。肺灌流にはシリコンチューブを取り付けたペリスタポンプを用いて流速  $8\text{ml/min}$  で 60 分間血管灌流した。肺胞の換気は主に carbogen gas を使用し、ビーカー内を絶えず陰圧に保ちながらレスピレーターを用いて湿潤ガス  $2\text{-}3\text{ml}$  を  $60\text{回/min}$  の頻度で注入して行なった。



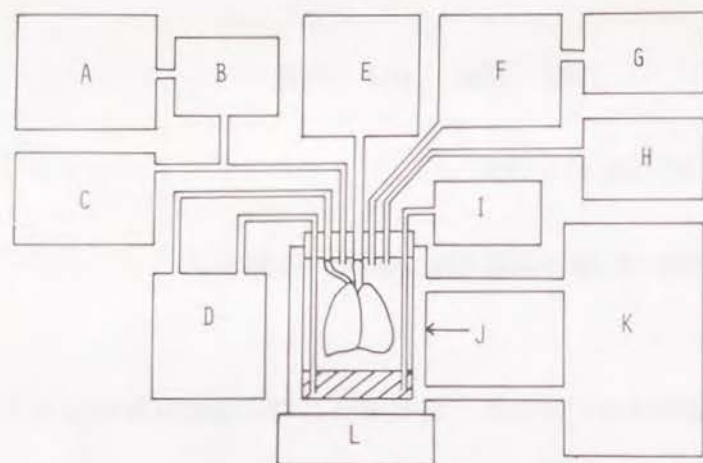


Fig.1 Schematic Diagram of Isolated Recirculated Rat Lung Preparation  
A, E, bag; B, humidifier; C, respirator; D, peristaltic pump;  
F, vacuum source; G, H, manometer; I, sampling tube; J, chamber;  
K, water bath; L, stirrer.

#### 4) 摘出肺灌流法

I-1 3) を一部改良して行なった。すなわち、ラットを麻酔下仰位に固定した後 heparin (1000IU/kg) を投与した。腹部正中線に沿って切開し下行大動脈より脱血した。脱血終了直前の吸気時に気管を結紮し、腹部側より胸部を切開

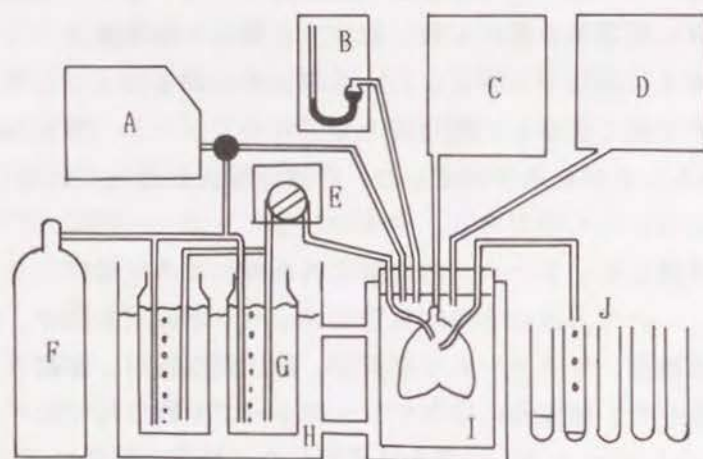


Fig.2 Schematic Diagram of Isolated Perfused Rat Lung Preparation  
A, respirator; B, manometer; C, bag; D, vacuum source;  
E, peristaltic pump; F, carbogen gas; G, water bath;  
H, water bath; I, chamber; J, sampling tube.

した後肺動脈カニューレを右心室より挿入し結紮糸で固定した。大部分の心臓を除去し、肺静脈カニューレを挿入して結紮した後、肺を摘出して灌流装置内に装着した (Fig.2)。

## I-2 薬物の肺移行性

### 1) 試薬及び試料溶液の調製

Quinine, sulfanilamide, sulfisoxazole, diphenhydramine, isoniazid, p-aminosalicylic acid, N-methylnicotinamide chloride,  $^{14}\text{C}$ -imipramine は市販品を使用した。Phenylbutazone, alloclamide, metoclopramide, imipramine, procainamide は藤沢薬品K.K.からの、また procainamide ethobromide は Squibb 社からの供与品を使用した。その他の試薬は市販品特級を使用した。薬液の調製は各薬物を生理食塩液、蒸留水、0.3N NaOH、0.3N HClを用いて等張溶液を作成し、pH 7.4 に液性を調製した。

### 2) 還流実験法

I-1 3) に従って行なった。還流液はラット新鮮血と carbogen gas で十分平衡に達した Krebs-Ringer bicarbonate 緩衝液の等量混液 10ml を使用した。還流液から肺組織への薬物移行実験の場合には還流開始時還流液に薬液を添加した。また肺胞から還流液への薬物移行実験の場合には気管より肺胞内に薬液を注入した。還流開始後還流液を定期的に採取し、還流液中薬物濃度を測定して薬物肺移行率を求めた。還流終了後、還流液を遠心して上清を得、membrane cone (Aminco Co., CF-50) による限外ろ過法<sup>9)</sup>を用いて蛋白に結合した薬物を分離除去した後、還流液中遊離薬物濃度を求めた。なお還流前後の肺重量変化を測定し、その差が 0.1g 以上となったもの、また還流液pHが 7.6 以上となったものはデータから削除した。更にまた肺重量・還流液pHが許容範囲内であっても血栓や肺気腫を生じたものについても同様にデータから削除した。

なお薬物肺蓄積に及ぼす代謝阻害剤の影響は、各代謝阻害剤を含む還流液で 15 分間肺還流した後、薬液 (0.1 $\mu\text{mol}$ ) を還流液に添加して更に 60 分間還流した時の薬物肺移行率より効果判定した。薬物相互の肺蓄積性を比較するための薬物共存実験は、還流開始時二種の薬物を還流液に添加して 60 分間還流実験を行



なった。また肺に蓄積した薬物の第二薬物添加による置換実験は、まず第一薬物を還流液に添加して30分間肺還流し、平衡状態に達した時点で第二薬物を還流液に添加して更に30分間還流した。この時の還流液注薬物濃度を定期的に測定した。

### 3) 肺胞洗浄

摘出肺に挿入した気管カニューレより注射器を用いて Krebs-Ringer sol. 2ml を注入し、次いで空気を 1ml 注入した。軽く揺り動かした後肺を転倒して流出する液を採取し、これを肺胞洗浄液とした。

### 4) 薬物定量法

A. Sulfanilamide, sulfisoxazole, procainamide, procainamide ethobromide, metoclopramide, p-aminosalicylic acid

Bratton-Marshall のジアゾ化法<sup>91)</sup>を一部改良して行なった。すなわち還流液 0.1ml に 0.1N HCl 2ml を加えてよく攪拌して 15 分間放置した後、10 % trichloroacetic acid 2ml を加えてよく攪拌し、15 分間放置してから 3000rpm 15 分間遠心した。上清を 3ml 採取して 0.2 % NaNO<sub>2</sub> 0.2ml を加え十分混和した後 3 分間放置し、次に 0.2 % sulfamic acid 0.5ml を加え十分混和して 3 分間放置してから 0.2 % Tsuda 試薬 0.2 ml を加えて発色させた。なお metoclopramide はジアゾ化合物が不安定なため遮光氷冷して上記操作を行なった。Procainamide は発色 60 分後に、他は 30 分後に波長 550nm における吸光度を測定した。

B. Quinine, alloclamide

Brodie らの蛍光法<sup>92)</sup>により定量を行なった。すなわち還流液 0.1ml または肺ホモジネート (10倍希釈) 1ml に 0.1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5ml を加えてよく攪拌し、15 分間放置した後 dichloroethane 7ml を加えて 15 分間激振し、遠心分離して水層を除去した。有機溶媒 5ml を採取してこれに 0.1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5ml を加え、15 分間激振し遠心した後水層の蛍光強度を測定した。励起波長及び蛍光波長は、quinine の場合各々 350nm, 450nm を、alloclamide の場合各々 270nm, 355nm を使用した。

C. Diphenhydramine

Dillらの方法<sup>93)</sup>に従って行なった。すなわち還流液 0.1ml または肺ホモ

ジネート 1ml に 0.1N NaOH 1ml を加え攪拌後 15 分間放置し、dichloroethane 7mlを加えて15分間振とうした後遠心分離した。水層を除去し、有機層に methylorange 飽和溶液1mlを加え攪拌後、遠心して有機層に 2 % 硫酸ethanol 1ml を加えて 550nm における吸光度を測定した。

D. <sup>14</sup>C-Imipramine

還流液及び肺ホモジネートをアルカリ性下 toluene 抽出し、遠心分離後有機層一定量に液体シンチレーション溶媒を加えた後、放射活性を Tri-Carb 液体シンチレーションカウンター (model 3330, Packard Instrument Co.) で測定した。

E. Phenylbutazone

Burns らの方法<sup>94)</sup>に従って行なった。すなわち還流液及び肺ホモジネートを酸性下 heptane 抽出し、遠心分離後有機層一定量に 1N NaOH を加えて水層に再抽出した。遠心分離後水層を 265nm で測定した。

F. Isoniazid

Nielsch らの方法<sup>95)</sup>に従って行なった。すなわち還流液及び肺ホモジネートを 0.1N Ba(OH)<sub>2</sub> 及び 5 % ZnSO<sub>4</sub> で除蛋白した後、上清 2ml に臭素飽和溶液 0.3ml 添加して 20 分間放置し更に 1M NaNO<sub>2</sub> 0.1ml 加えた。15 分間放置後適量の酢酸を加え pH 5 に調製し、濃厚酢酸緩衝液 (pH5) 0.5容, 10% KCN 0.2容, 10 % chloramine-T 1容, 10 % CH<sub>3</sub>COOH 0.8容, 2 % barbituric acid (pH5.0) 2.5容, acetone 1容の混液 (用時調製) 5ml を加えて 1 時間暗所に放置した後 2,500rpm 15 分間遠心し、上清の 600nm における吸光度を測定した。

G. N-Methylnicotinamide chloride

Carpenter らの方法<sup>96)</sup>に従って行なった。すなわち還流液及び肺ホモジネートを 10 % trichloroacetic acid で除蛋白した後、上清 2ml に methylethylketone 1ml を添加しよく攪拌した。これに 5N NaOH 0.5ml 添加してよく混和し、5 分間放置した後 5N HCl 0.75ml を加え 70℃ で 5 分間加熱した。冷却後 20 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2ml 加え精製水で 20ml に調製した後励起波長 400nm, 蛍光波長 460 nm で蛍光強度を測定した。

### 5) 代謝物の検討

還流実験終了後の肺組織中及び還流液中の代謝物は、塩基性薬物の場合 chloroform で、中性・酸性薬物の場合 acetone で各々抽出し、濃縮した後、Silica



Gel HF254 (Merck Co.) を用いて薄層クロマトグラフを行なった。展開溶媒は、N-methylnicotinamide については methanol-acetic acid (v/v, 1:1) を、diphenhydramine については chloroform-acetone-ethanol (v/v, 1:1:2) を、他の薬物については chloroform-acetone-ethanol (v/v, 1:1:1) を使用した。

#### 6) 分配係数の測定

Hogben らの方法<sup>97)</sup>に準じて行なった。すなわち、共栓試験管に薬物を含む pH 7.4 等張リン酸緩衝液と等量の chloroform を入れて 37℃恒温槽に浸し 3 時間 30 分毎に激振した後、更に 6 時間恒温槽中に静置した。次いで水層、有機層を採取して薬物濃度を測定し、下式に基づいて分配係数を求めた。

$$\text{分配係数} = \text{有機層中薬物濃度} / \text{水層中薬物濃度}$$

### I - 3 抗生物質の肺移行性

#### 1) 試薬及び試料溶液の調製

Tetracycline, <sup>3</sup>H-tetracycline, chloramphenicol は市販品を使用した。Leucomycin A<sub>3</sub>, 3"-propionyl leucomycin A<sub>5</sub>, <sup>14</sup>C-3"-propionyl leucomycin A<sub>5</sub>, erythromycin, cefalexin は東洋醸造K.K.からの供与品を使用した。その他の試薬は市販品特級を使用した。薬液の調製は各薬物を生理食塩液、蒸留水、0.3N NaOH, 0.3N HCl を用いて等張溶液を作成し pH 7.4 に液性を調製した。

#### 2) 還流実験法

I-2 2) に従って行なった。

#### 3) 肺胞洗浄

I-2 3) に従って行なった。

#### 4) 薬物定量法

##### A. Leucomycin A<sub>3</sub>, erythromycin

還流液及び肺組織中薬物濃度はペーパーディスク法による抗菌活性より求めた。菌株には *Sarcina lutea* ATCC9341 を使用した。

##### B. <sup>14</sup>C-3"-propionyl-leucomycin A<sub>5</sub>, <sup>3</sup>H-tetracycline

還流液及び肺組織をサンプルオキシダイザー (model 306, Packard Instrument Co.) を用いて酸化し、生じた <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O を液体シンチレーション溶媒に溶解した後、放射活性を Tri-Carb 液体シンチレーションカウンター (model 3330, Packard Instrument Co.) で測定した。

##### C. Chloramphenicol

山崎らの方法<sup>98)</sup>に従って行なった。

##### D. Cefalexin

還流液及び肺組織に4倍量の methanol を加えて除蛋白した後、高速液体クロマトグラフィーにより定量した。測定条件は、装置：島津 LC-3A, カラム：chemcosorb ODS (15cmX4.6mm), 展開溶媒：0.03M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) - methanol (82:18), 流速：1.3ml/min, 測定波長：262nm, 注入量：50μl, カラム温度：40℃で行なった。

#### 5) 代謝物の検討

##### A. Leucomycin A<sub>3</sub>, erythromycin

還流液及び肺組織中の抗生物質及びその代謝物は methanol で除蛋白した後濃縮し、Silica Gel F spotfilm (東京化成工業K.K.) で薄層クロマトグラフィーを行い、生物活性測定用のアガロースゲルに張り付けて各部位の抗菌活性を求めた。なお展開溶媒は、leucomycin A<sub>3</sub> には chloroform-methanol-ethylacetate-water (v/v, 59:11:8:2) を、erythromycin には chloroform-methanol-2% ammonia water (v/v, 10:4.5:1) を使用した。

##### B. <sup>3</sup>H-Tetracycline, <sup>14</sup>C-3"-propionyl-leucomycin A<sub>5</sub>

還流液及び肺組織中の抗生物質及びその代謝物は、tetracycline については methanol でまた 3"-propionyl-leucomycin A<sub>5</sub> については acetonitrile で除蛋白した後濃縮し、Silica Gel G (Merck Co.) を用いて薄層クロマトグラフィーを行なった。展開後薄層プレートを一定間隔で掻き取り、各部位における放射活性を測定した。展開溶媒は、tetracycline には butanol-methanol-14% citric water (v/v, 4:1:2), 3"-propionyl-leucomycin A<sub>5</sub> には chloroform-methanol-ethylacetate-water (v/v, 59:11:8:2) を使用した。

##### C. Chloramphenicol

還流液あるいは肺ホモジネートの chloroform 抽出液を濃縮した後、



Silica Gel G (Merck Co.) にスポットし展開溶媒として chloroform-methanol-14 % ammoniacal water (v/v, 10:4.5:1) を用いて薄層クロマトグラフィーを行なった。展開後二波長薄層クロマトスキャナー (島津製作所 CS-900) を用いて薄層プレート上の 265nm におけるU.V.吸収を測定した。

## 第II章 実験の部

### II-1 還流肺の細胞成分分画

#### 1) 試薬及び試料溶液の調製

$^{14}\text{C}$ -Metoclopramide は藤沢薬品KKからの供与品を使用した。その他の試薬ならびに試料溶液の調製は I-2 1) に従って行なった。

#### 2) 還流実験法

I-2 3) に従って行なった。

#### 3) 細胞成分分画

還流後肺組織を細片化し、9 倍量の pH 7.4 0.25M sucrose-3.4mM Tris溶液 (S.T.buffer) を加えてフロン Potter-Elvehjem ホモジナイザーを用いて氷冷下ホモジナイズした。肺ホモジネートを二重ガーゼでろ過した後、冷却遠心機 (日立製作所, RPR 18-3 rotor) で 600 $\times$ g 10 分間遠心し、上清を 3,300 $\times$ g 20 分間再遠心して得られた沈渣部分を各々第1画分、第2画分とした。3,300 $\times$ g 上清画分を 10,000 $\times$ g 20 分間遠心し得られた沈渣部分を第3画分とし、上清画分を超遠心機 (日立製作所, RPR-55 rotor) で再度 192,000 $\times$ g 45 分間遠心分離して沈渣部分を第4画分、上清部分を第5画分とした (Fig.3)。各画分は S.T.buffer に浮遊させた後、薬物濃度、蛋白濃度、各種指標酵素活性を測定した。

#### 4) 薬物定量法

$^{14}\text{C}$ -Metoclopramide の定量は、試料を過酸化水素で処理した後液体シンチレーション溶媒 (monophase-40, Packard Instrument Co.) を加え、放射活性を Tri-Carb 液体シンチレーションカウンターで測定した。その他の薬物について

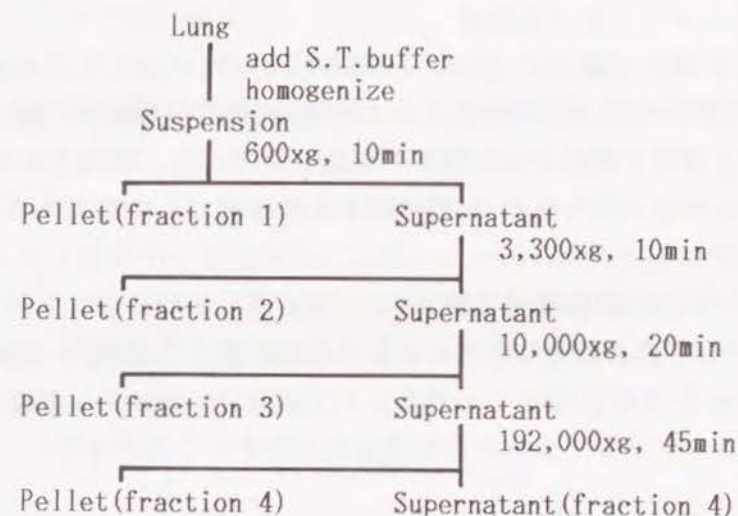


Fig.3 Subcellular Fractionation

は、I-2 4) に従って測定した。

#### 5) 指標酵素活性測定法

ミトコンドリア外膜の指標酵素であるモノアミン酸化酵素は Tipton らの方法<sup>99)</sup>、ミトコンドリア内膜の指標酵素であるチトクローム酸化酵素は Cooperstein らの方法<sup>100)</sup>、細胞膜の指標酵素である5'-ヌクレオチダーゼは Averuch らの方法<sup>101)</sup>、ミクロソームの指標酵素であるグルコース-6-ホスファターゼは Swenson らの方法<sup>102)</sup>、ライソゾームの指標酵素である酸ホスファターゼは de Duve らの方法<sup>103)</sup>に従って行なった。

#### 6) 蛋白定量法

Lowry らの方法<sup>104)</sup>に従って行なった。

### II-2 ミトコンドリアの薬物結合性

#### 1) 試薬及び試料溶液の調製

II-1 1) に従って行なった。



## 2) 肺ミトコンドリア画分の調製

II-1 3) に従って肺ミトコンドリア画分を分取した後, S.T.buffer に浮遊させて再度  $3,300\times g$  20 分間遠心した。この洗浄操作を4回繰り返した後最後の沈渣をミトコンドリア画分として以下の実験に使用した。最終洗浄ミトコンドリアの精製度はホモジネートの約 8 倍の酵素活性を有していた。

## 3) ミトコンドリア薬物結合実験

ミトコンドリア (0.5mg protein) を各種濃度の薬液と  $37^{\circ}\text{C}$  でインキュベートした。 $40,000\times g$  5 分間遠心して上清画分と沈渣画分に分け各々遊離薬物濃度測定用並びにミトコンドリア薬物結合量測定用検体として用いた。

## 4) 還流実験法

I-2 3) に従って行なった。

## 5) 薬物定量法, 指標酵素活性測定法, 蛋白定量法

I-2 4), II-1 5) ならびに II-1 6) に従って測定した。

## 6) データ解析

薬物結合飽和曲線は Scatchard らの方法<sup>105)</sup>により解析し, 各薬物の結合定数 ( $K_a$ ) 及び最大薬物結合部数 ( $B_{\text{max}}$ ) を決定するために最小二乗法により回帰曲線を求めた。各競合阻害剤に対する阻害定数 ( $K_i$ ) は Lineweaver-Burk の方法<sup>106)</sup>により求めた。

## II-3 ミトコンドリア内における薬物局在性

### 1) 試薬及び試料溶液の調製

II-1 1) に従って行なった。

### 2) 還流実験法, 肺ミトコンドリア画分分取

各々, I-2 3), II-1 3) に従って行なった。

## 3) ミトコンドリア細分画法

Greenawalt らによるジギトニン分画法<sup>107)</sup>を用いて行なった。すなわち氷冷下ミトコンドリア浮遊液を緩やかに攪拌しながらジギトニン溶液を添加し, 更に 15 分間緩やかに攪拌した後, 3 倍容の S.T.buffer を加えてジギトニンを希釈した。この希釈浮遊液を  $12,000\times g$  12 分間遠心した後, 更に上清を  $105,000\times g$  90 分間遠心して上清画分と沈渣画分に分離した。得られた画分を各々ミトコンドリアの第1画分, 第2画分, 第3画分とした (Fig.4)。各画分は S.T.buffer に浮遊させた後, 薬物濃度, 蛋白濃度, 各種指標酵素活性を測定した。

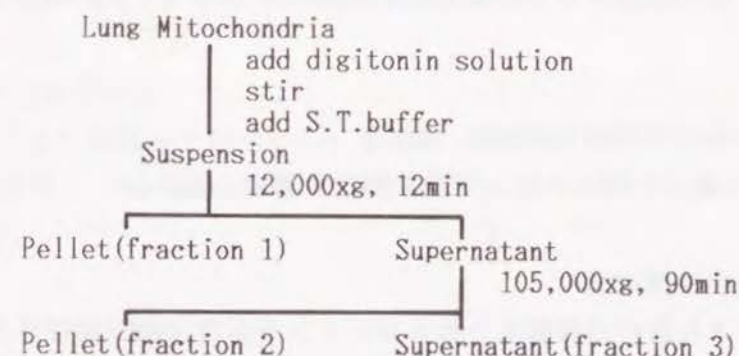


Fig.4 Submitochondrial Fractionation

## 4) 薬物定量法

II-1 4) に従って測定した。

## 5) 指標酵素活性測定法

### A. モノアミン酸化酵素, チトクロム酸化酵素

II-1 5) に従って測定した。

B. ミトコンドリア膜間スペースの指標酵素である亜硫酸チトクロムC還元酵素の活性は Wattiaux-De Coninck らの方法<sup>108)</sup>に従い, またミトコンドリアマトリックスの指標酵素であるマレート脱水素酵素の活性は Marco らの方法<sup>109)</sup>に従って行なった。



## 第Ⅲ章 実験の部

### Ⅲ-1 ミトコンドリアにおける塩基性薬物のMAO阻害

#### 1) 試薬及び試料溶液の調製

$^{14}\text{C}$ -Phenylethylamine,  $^{14}\text{C}$ -tyramine,  $^{14}\text{C}$ -5-hydroxytryptamine は市販品を使用した。その他の試薬ならびに試料溶液の調製は I-2 1) に従って行なった。

#### 2) 肺ミトコンドリア画分の調製

Ⅱ-2 2) に従って肺ミトコンドリア画分を調製した。

#### 3) 指標酵素活性測定法

ミトコンドリア外膜の指標酵素であるロテノン不応性 NADH 依存性チトクロム C 還元酵素及びキヌレニン脱水素酵素の活性は各々 Sottocase らの方法<sup>110)</sup>, Okamoto らの方法<sup>111)</sup>を用いて測定した。その他の酵素については Ⅱ-3 6) に従って行なった。

#### 4) MAO活性阻害実験

ミトコンドリア浮遊液 100 $\mu\text{l}$ を 30℃で 5 分間インキュベートした後、放射活性基質 100 $\mu\text{l}$  及び阻害剤を加え反応を開始した。反応中絶えず振とうして一定時間反応させた後、2M (COOH)<sub>2</sub> を加えて反応を停止させた。これに抽出溶媒を加えて激振し、遠心分離後有機層を一定量採取した。これに液体シンチレーション溶媒を加え放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。測定値を代謝物の抽出効率で補正した後代謝活性を nmol 代謝物/mg 蛋白/min で示した。実験は全て代謝物生成が時間に対して直線性を示す期間内で行なった。

#### 5) データ解析

代謝飽和曲線は Lineweaver-Burk plots<sup>106)</sup>により解析し、各基質の解離定数 (Km) 及び最大代謝速度 (Vmax) を決定するために最小二乗法により回帰直線を

求めた。各阻害剤の阻害定数 (Ki) も同様の方法で求めた。

### Ⅲ-2 灌流肺における塩基性薬物のMAO阻害

#### 1) 試薬及び試料溶液の調製

$^{14}\text{C}$ -Phenylethylamine は市販品を使用した。その他の試薬ならびに試料溶液の調製は I-2 1) に従って行なった。

#### 2) 摘出肺灌流法

I-1 4) に従って行なった。灌流液には 3.5 % BSA Krebs-Ringer sol. (pH 7.4) を使用し、carbogen gas で十分酸素化すると共に 37℃に保温したものを灌流した。

#### 3) MAO活性測定

Ⅱ-1 5) に従って行なった。

### Ⅲ-3 塩基性薬物の肺蓄積部位におけるMAOの寄与

#### 1) 試薬及び試料溶液の調製

Harmaline, pargyline, iproniazid, semicarbazide, aminoacetonitrile は市販品を使用した。その他の試薬及び試料溶液の調製は I-2 1) に従って行なった。

#### 2) 肺ミトコンドリア画分の調製

Ⅱ-2 2) に従って肺ミトコンドリア画分を調製した。

#### 3) MAOIによるミトコンドリア薬物結合阻害実験

肺ミトコンドリアを氷冷下各MAOI 1mM 中で15分間処理した後、Ⅱ-2 3)



に従って結合実験を行ないMAOI処理時のミトコンドリア薬物結合性を求めた。

#### 4) 還流実験法

摘出肺をMAOI 1mM を含む還流液で 15 分間前処理した後、薬物を還流液に添加しその肺移行率も求めた。

#### 5) 灌流実験法

摘出肺をMAOI 0.5mM を含む灌流液で 15 分間前処理した後、薬物とMAOIの共存灌流液を灌流し薬物肺移行量も求めた。

#### 6) 薬物定量法

I-2 4) に従って測定した。

## 引用文献

- 1) 村田敏郎, 有田隆一編, 生物薬剤学, 南江堂, 東京 (1975).
- 2) B.N.LaDu, H.G.Mandel and E.L.Way, ed. Fundamentals of drug metabolism and drug disposition, Williams and Wilkins, Baltimore (1971).
- 3) R.Hori, K.Sunayashiki and A.Kamiya, Chem. Pharm. Bull.(Tokyo), 26, 740 (1978).
- 4) R.Hori, M.Arakawa and K.Okumura, Chem. Pharm. Bull.(Tokyo), 26, 1135 (1978).
- 5) K.Okumura, M.Arakawa and R.Hori, J. Pharm. Sci., 69, 157 (1980).
- 6) K.Okumura, I.P.Lee and R.L.Dixon, J. Pharmacol. Exp. Ther., 194, 89 (1975).
- 7) B.Fichtl, B.Bondy and H.Kurz, J. Pharmacol. Exp. Ther., 215, 248 (1980).
- 8) 内山照雄, 代謝, 13, 149 (1976).
- 9) 村山 普, 薬剤学, 40, 1 (1980).
- 10) J.D.Brain and P.A.Valberg, Am. Rev. Resp. Dis., 120, 1325 (1979).
- 11) U.Smith and J.W.Ryan, Fed. Proc., 32, 1957 (1973).
- 12) Y.Iwasawa and C.N.Gillis, J. Pharmacol. Exp. Ther., 188, 386 (1974).
- 13) R.D.Pickett, M.W.Anderson, T.C.Orton and T.E.Eling, J. Pharmacol. Exp. Ther., 194, 545 (1975).
- 14) A.F.Junod, J. Pharmacol. Exp. Ther., 183, 341 (1972).
- 15) J.H.Linehan, C.A.Dawson and V.M.Wagner-Weber, J. Appl. Physiol., 50, 428 (1981).
- 16) H.-J.Lee, J.N.Larue and I.B.Wilson, Biol. Biochim. Acta, 250, 549 (1971).
- 17) R.J.Freer and J.M.Stewart, Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 217, 97 (1975).
- 18) A.F.Junod, Pharmac. Ther. B, 2, 511 (1976).
- 19) A.F.Junod and C.Ody, Am. J. Physiol., 232, C-88 (1977).
- 20) R.J.King, Fed. Proc., 33, 2238 (1974).



- 21) 北村 諭, 医学のあゆみ, 117, 593 (1981).
- 22) F.C.P.Law, T.E.Eling, J.R.Bend and J.R.Fouts, Drug Metab. Disp., 2, 433 (1974).
- 23) T.R.Devereux, G.E.R.Hook and J.R.Fouts, Drug Metab. Disp., 7, 70 (1979).
- 24) T.R.Devereux and J.R.Fouts, Biochem. Pharmacol., 30, 1231 (1981).
- 25) Y.-J.Lin and L.S.Schanker, Biochem. Pharmacol., 30, 2937 (1981).
- 26) B.A.Freeman and J.J.O'Neil, Environ. Health Perspect., 56, 51 (1984).
- 27) S.Levey and R.Gast, J. Appl. Physiol., 21, 313 (1966).
- 28) R.W.Niemeier and E.Bingham, Life Sci., 11, 807 (1972).
- 29) P.M.Rosenbloom and A.D.Bass, J. Appl. Physiol., 29, 138 (1970).
- 30) N.Martin, Phil. Trans. Roy. Soc. London, 174, 663 (1883).
- 31) R.A.Rhoades, Am. J. Physiol., 226, 144 (1974).
- 32) L.Strebel and P.E.Siegler, Arch. Surg., 96, 471 (1968).
- 33) 岡本永義, 日胸外会誌, 19, 25 (1971).
- 34) A.C.Burton and D.J.Patel, J. Appl. Physiol., 12, 239 (1958).
- 35) R.A.Roth and D.A.Wiersma, Clin. Pharmacokin., 4, 355 (1979).
- 36) M.E.McManus, A.R.Boobis, G.M.Pacific, R.Y.Frempong, M.J.Brodie, G.C.Kahn, C.Whyte and D.S.Davies, Life Sci., 26, 481 (1980).
- 37) E.A.B.Brown, Drug Metab. Rev., 3, 33 (1974).
- 38) M.W.T.Anderson, T.C.Orton, R.D.Pickett and T.E.Eling, J. Pharmacol. Exp. Ther., 189, 456 (1974).
- 39) C.L.Huang, J.Z.Yen and I.A.Muni, J. Pharmac. Sci., 59, 1114 (1970).
- 40) R.M.Effros and F.P.Chinard, J. Clin. Invest., 48, 1983 (1969).
- 41) C.Post, R.G.G.Anderson, A.Ryrfeldt and E.Nilsson, Acta Pharmacol. Toxicol., 43, 156 (1978).
- 42) R.F.Minchin and K.F.Ilett, J. Pharm. Pharmacol., 33, 464 (1981).
- 43) G.Giannopoulos, Steroids, 23, 845 (1974).
- 44) T.E.Nicholas and P.A.Kim, Steroids, 25, 387 (1975).
- 45) T.H.Gardiner, J.M.Lewis and P.A.Shore, J. Pharmacol. Exp. Ther., 206, 151 (1978).

- 46) R.A.Roth Jr., J.A.Roth and C.N.Gillis, J. Pharmacol. Exp. Ther., 200, 394 (1977).
- 47) C.H.Chi and B.N.Dixit, Br. J. Pharmac., 59, 539 (1977).
- 48) D.H.M.Lau and G.L.Henderson, J. Pharmacol. Exp. Ther., 206, 143 (1978).
- 49) M.E.Davis and H.M.Mehendale, Drug Metab. Disp., 7, 425 (1979).
- 50) R.J.Willis and C.C.Kratzing, Pflugers Arch., 356, 93 (1975).
- 51) C.T.Dollery and A.F.Junod, Brit. J. Pharmac., 57, 67 (1976).
- 52) L.S.Angevine and H.M.Mehendale, Toxicol. Appl. Pharmacol., 52, 336 (1980).
- 53) Y.Ohmiya and H.M.Mehendale, Drug Metab. Disp., 7, 442 (1979).
- 54) T.C.Orton, M.W.Anderson, R.D.Pickett, T.E.Eling and J.R.Fouts, J. Pharmacol. Exp. Ther., 186, 482 (1973).
- 55) R.F.Minchin, B.W.Madsen and K.F.Ilett, J. Pharmacol. Exp. Ther., 211, 514 (1979).
- 56) W.Herken and N.Rietbrock, Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 26, 99 (1969).
- 57) J.S.Fowler, B.M.Gallagher, R.R.MacGregor and A.P.Wolf, J. Pharmacol. Exp. Ther., 198, 133 (1976).
- 58) Y.Hiro and Y.Doi, J. Antibiotics ser-B, 22, 85 (1967).
- 59) K.Fukaya, M.Hayakawa and O.Kitamoto, Chemotherapy, 18, 252 (1970).
- 60) K.Nitta, J. Antibiotics ser-A, 20, 181 (1967).
- 61) K.Kanamori, Chemotherapy, 5, 83 (1957).
- 62) L.S.Schanker, Biochem. Pharmacol., 27, 381 (1978).
- 63) 菊池九二三, 生化学, 54, 293 (1982).
- 64) A.Marzo, P.Ghirardi, A.Preti and A.Lombardo, Biochem. Pharmacol., 25, 371 (1976).
- 65) 三宅可浩, 代謝, 12, 363 (1975).
- 66) 森 正敬, 橘 正道, 代謝, 13, 627 (1976).
- 67) G.E.R.Hook, J.R.Bend, D.Hoel, J.R.Fouts and T.E.Grain, J. Pharmacol. Exp. Ther., 182, 474 (1972).
- 68) D.W.Schneck, J.F.Pritchard and A.H.Hayes, Jr., J. Pharmacol. Exp.



- Ther., 203, 621 (1977).
- 69) R.F.Minchin, K.F.Ilett and B.W.Madsen, *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 2273 (1979).
  - 70) A.Huunan-Seppala, *Acta Chem. Scand.*, **26**, 2713 (1972).
  - 71) M.H.Bickel and J.W.Steele, *Chem. Biol. Interact.*, **8**, 151 (1974).
  - 72) A.Nishiura, T.Murakami, Y.Higashi and T.Yata, *Pharm. Res.*, **5**, 209 (1988).
  - 73) J.W.Greenawalt, *Methods Enzymol.*, **31**, 310 (1974).
  - 74) B.B.Brodie, *J.A.M.A.*, **202**, 600 (1967).
  - 75) 伊藤明夫, 蛋白質・核酸・酵素, **30**, 27 (1985).
  - 76) J.A.Roth and C.N.Gillis, *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 2537 (1974).
  - 77) C.J.Fowler, B.A.Callingham, T.J.Mantle and K.F.Tipton, *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 1177 (1980).
  - 78) 鈴木 修, 生化学, **52**, 158 (1980).
  - 79) M.D.Houslay, K.F.Tipton and M.B.Youdin, *Life Sci.*, **19**, 467 (1976).
  - 80) 杵瀬宏育, 上条一也, 蛋白質・核酸・酵素, **25**, 1069 (1980).
  - 81) H.C.Kung and A.G.E.Wilson, *Life Sci.*, **24**, 425 (1979).
  - 82) R.M.Cawthon and X.O.Breakefield, *Nature*, **281**, 692 (1979).
  - 83) K.F.Tipton, M.D.Houslay and T.J.Mantle, In G.E.M.Wolstenholme and J. Knight(eds.), *Monoamine oxidase and its inhibition*, Elsevier, Amsterdam, 1976, pp5-32.
  - 84) R.R.Ben-Harari and Y.S.Bakhle, *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 489 (1980).
  - 85) J.A.Roth and C.N.Gillis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **194**, 537 (1975).
  - 86) A.B.Bevan-Jones, C.M.B.Pare, W.J.Nicholson, K.Price and R.S.Stacy, *Brit. Med. J.*, **1**, 17 (1972).
  - 87) M.B.H.Youdim, G.G.S.Collins, M.Sandler, A.B.Bevan-Jones, C.M.B.Pare and W.J.Nicholson, *Nature*, **30**, 225 (1972).
  - 88) L.Hellerman and V.G.Erwin, *J. Biol. Chem.*, **243**, 5234 (1968).
  - 89) D.Parkinson and B.A.Callingham, *J. Pharm. Pharmacol.*, **32**, 49 (1980).
  - 90) 大和田栄治, 堀 了平, 有田隆一, 薬剂学, **33**, 125 (1973).
  - 91) A.C.Bratton and E.K.Marshall, Jr., *J. Biol. Chem.*, **128**, 537 (1937).
  - 92) B.B.Brodie, S.Udenfriend, W.Dill and G.Downing, *J. Biol. Chem.*, **168**,

- 311** (1947).
- 93) W.A.Dill and A.J.Glazko., *J. Biol. Chem.*, **179**, 395 (1949).
- 94) J.J.Burns, R.K.Rose, T.Chenkin, A.Goldman, A.Schulert and B.B. Brodie, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **109**, 346 (1953).
- 95) W.Nielsch and L.Giefer, *Arzneim.-Forsch.*, **9**, 636 (1959).
- 96) K.J.Carpenter and E.Kodicek, *Biochem. J.*, **46**, 421 (1950).
- 97) C.A.M.Hogben, D.J.Tocco, B.B.Brodie and L.S.Schanker, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **125**, 275 (1959).
- 98) 山崎 勝, 重尾節子, 鎌田 皎, 薬剂学, **34**, 97 (1974).
- 99) K.F.Tipton and B.H.Youdin, in *Monoamine oxidase and its inhibition*, ed. by S.S.Kety, Elsevier, Amsterdam, p393 (1976).
- 100) S.J.Cooperstein and A.Lazarow, *J. Biol. Chem.* **189**, 665 (1951).
- 101) J.Averuch and D.F.H.Wallach, *Biochem. Biophys. Acta.*, **233**, 334 (1971).
- 102) M.A.Swenson, *Methods Enzymol.*, **2**, 541 (1955).
- 103) C.deDuve, B.C.Pressman, R.Gianetto, R.Wattiaux and F.Appelmans, *Biochem. J.*, **60**, 604 (1955).
- 104) O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.L.Farr and R.J.Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 105) G.Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **51**, 660 (1949).
- 106) H.Lineweaver and D.Burk, *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658 (1934).
- 107) J.W.Greenawalt, *Methods Enzymol.*, **31**, 310 (1974).
- 108) S.Wattiaux-De Coninck and R.Wattiaux, *Eur. J. Biochem.*, **19**, 552 (1971).
- 109) R.Marco, J.Sebastian and A.Sols, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **34**, 725 (1969).
- 110) G.L.Sottocase, B.Kuylensstierna, L.Ernster and A.Bergstrand, *J. Cell Biol.*, **32**, 415 (1967).
- 111) H.Okamoto and O.Hayaishi, *Arch. Biochem. Biophysics*, **131**, 603 (1969)